

**WECHSELWIRKUNGEN
VON TRANSFER-RIBONUKLEINSÄUREN
MIT AMINOACYL-tRNA-SYNTHEASEN
AUS HEFE**

Ulrich Pachmann

1975



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551910_0017

Aus dem Institut für physiologische Chemie und physikalische Biochemie
der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Bücher, Prof. Dr. M. Klingenberg,
Prof. Dr. H.G. Zachau

WECHSELWIRKUNGEN
VON TRANSFER-RIBONUKLEINSÄUREN
MIT AMINOACYL-tRNA-SYNTHETASEN
AUS HEFE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ulrich Pachmann
aus
München

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. G. Zachau

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Klingenberg

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 3. 1975



Meinen Eltern

Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

R. Rigler, E. Cronvall, R. Hirsch, U. Pachmann und H.G. Zachau, FEBS lett. 11 (1970), 320

R. Rigler, E. Cronvall, M. Ehrenberg, U. Pachmann, R. Hirsch und H.G. Zachau, FEBS lett. 18 (1971), 193

U. Pachmann, E. Cronvall, R. Rigler, R. Hirsch, W. Wintermeyer und H.G. Zachau, Europ. J. Biochem. 39 (1973), 265

Herr Prof. Dr. H.G. Zachau hat diese Arbeit durch Anregungen und stete Anteilnahme sehr gefördert; dafür danke ich vielmals. Herrn Doc. Dr. R. Rigler danke ich vielmals; die Arbeit in seinem Labor, die Zusammenarbeit und die Diskussionen mit ihm und mit M. Ehrenberg und E. Cronvall in seiner Arbeitsgruppe waren für mich sehr lehrreich und anregend. Herrn Dr. R. Hirsch danke ich herzlich für wertvolle Diskussionen und Ratschläge, und für die Präparation der Synthetasen. Für die Überlassung von tRNA danke ich Herrn Dr. W. Wintermeyer und den Herren Dozenten Dr. F. Fittler und Dr. R. Thiebe, sowie Herrn Dr. P. Philippsen. Herrn Professor U. Lagerkvist danke ich für die Überlassung von Valyl-tRNA-Synthetase und tRNA^{Val}. Frau R. Jakabffy danke ich für ihre Hilfe bei den Auswertungen und beim Zeichnen der Abbildungen, Frau B. Larsson und Frau R. Lamm danke ich für ihre Hilfe bei Enzymtests.

Riksföreningen mot Cancer, Stockholm, hat meine Arbeit unter den Projekt-Nummern 150-B71-06P, 150-B72-08P und 722-B73-01P in dankenswerter Weise unterstützt. Von der Deutschen Forschungsgemeinschaft wurde die Arbeit unter der Projektnummer A3 im Sonderforschungsbereich 51 gefördert.

Herr Dr. W. Hörz sah freundlicherweise den Abschnitt Summary, Herr Dr. R. -E. Streeck die Zusammenfassung durch. Die Reinschrift fertigte Frau H. Haindl an.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen tRNAs und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen mit Hilfe der Tryptophanfluoreszenz der Synthetasen	7
2.1. Einfluß des Titrationsvorgangs auf Floreszenz und Aktivität von SRS. Kontrollen zur Methode	8
2.2. Auswertung der Fluoreszenztitrationen	10
2.3. Abhängigkeit des Bindungsgleichgewichts von tRNA ^{Ser} und SRS von den Pufferbedingungen	11
2.3.1. Einfluß verschiedener Salze	11
2.3.2. Einfluß des pH-Werts der Lösung	15
2.3.3. Einfluß von Glycerin	18
2.4. Alterung von SRS	19
2.5. Titrationsen bei verschiedenen Temperaturen	20
2.6. Titrationsen bei verschiedenen SRS-Konzentrationen	21
2.7. Titrationsergebnisse mit PRS	22
3. Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen tRNA und Aminoacyl-tRNA-Synthetase mit Hilfe von Fluorophor-markierter tRNA	25
3.1. Beweglichkeit des Fluorophors und Polarisationsgrad	25
3.2. Experimente mit assoziativ an tRNA gebundenem Proflavin (PF) und Ethidiumbromid (EB)	27
3.2.1. Bindungsgleichgewichte von tRNA ^{Ser} und tRNA ^{Phe} mit PF und EB	28
3.2.2. Aminoacylierungsgeschwindigkeit in Gegenwart von EB	34
3.2.3. Titration assoziativ mit EB markierter tRNA mit SRS	36
3.3. Messungen mit Hilfe von kovalent an tRNA gebundenem EB	38

	Seite
3.3.1. Vergleich nicht modifizierter mit modifizierten tRNAs	38
3.3.2. Abhängigkeit der Fluoreszenzpolarisation von tRNA _{EB} von der KCl- und MgCl ₂ -Konzentration im Puffer	42
3.3.2.1. Salzabhängigkeit der Beweglichkeit freier tRNA _{EB}	42
3.3.2.2. Abhängigkeit der Wechselwirkungen zwischen tRNA und Synthetase von der KCl-Konzentration im Puffer	44
3.3.2.3. Abhängigkeit der Wechselwirkungen zwischen tRNA und Synthetase von der MgCl ₂ -Konzentration im Puffer	46
3.4 Untersuchungen zur Topographie der tRNA-Bindungs- stellen an Aminoacyl-tRNA-Synthetasen	49
3.4.1. Bindung von tRNA ^{Ser} -Fragmenten an SRS in Gegen- wart von assoziativ an das Fragment gebundenem EB	50
3.4.2. Konkurrenz von tRNA ^{Phe} _{EB} - mit tRNA ^{Ser} -Fragmenten um Bindungsstellen an SRS	53
3.4.3. Konkurrenz von tRNA ^{Ser} _{EB} mit tRNA ^{Phe} -Fragmenten um Bindung an PRS	53
3.4.4. Konkurrenz von tRNA ^{Phe} _{EB} mit tRNA ^{Ser} um Bindung an PRS	55
4. Untersuchungen zur Kooperativität der Bindung von tRNA ^{Ser} an SRS	56
4.1. Durchführung und Auswertung	57
4.2. Kontrollen	60
5. Diskussion	63
5.1. Auswertung der Experimente	63
5.2. Vergleich der benutzten Methoden	65
5.2.1. Titrationen, bei denen Änderungen der Synthetase- fluoreszenz ausgewertet wurden	65

	Seite
5.2.2. Titrationen, bei denen die Fluoreszenzpolarisation Ethidium-markierter tRNA ausgewertet wurde	66
5.2.3. Bindungskinetik von tRNA ^{Ser} und SRS	66
5.2.4. Messung der Aminoacylierungsgeschwindigkeit	67
5.3. Abhängigkeit von Bindung und Reaktion von der Ionenstärke	69
5.4. Nicht-ionische Wechselwirkungen und Spezifität	71
6. Versuchsbeschreibung und benutzte Substanzen	73
6.1. tRNA- und Synthetasepräparate, sonstige Substanzen	73
6.2. Durchführung der Titrationen	73
6.3. Apparative Hilfsmittel für Titrationen	74
6.4. Korrektur der Proteinfluoreszenz für Nukleinsäure- absorption	77
6.5. Aktivitätstest	78
6.6. Analytische Disk-Elektrophorese in Polyacrylamid- gelen	79
6.7. Puffer, sonstiges	80
7. Zusammenfassung. Summary	81
8. Literaturverzeichnis	87
9. Verzeichnis der Abkürzungen	96

1. Einleitung und Problemstellung

Mit der Entdeckung, daß hohe RNA-Konzentrationen und rasche Proteinsynthese in der Zelle eng korreliert sind, leitete Caspersson 1941 (1) die Analyse der Zusammenhänge zwischen Nukleinsäuren und Proteinbiosynthese ein. Zunächst mußten allerdings die beiden Probleme, wie Protein in der Zelle entsteht, und welche Aufgaben die Nukleinsäuren erfüllen, getrennt bearbeitet werden.

Wie entsteht Protein? Um Peptide bilden zu können, müssen Aminosäuren "aktiviert" werden (2). Als Aktivatoren kamen energiereiche Phosphate in Betracht (3, 4). Enzyme, die die Bildung von Anhydridbindungen zwischen Aminosäuren und AMP unter Spaltung von ATP katalysieren, wurden 1955 (5) gefunden (Übersicht in (6)). Neben Matrizen-RNA, Ribosomen und den Enzymen, die die Aminosäuren aktivieren, befand sich im Cytoplasma eine weitere Klasse von Makromolekülen, die für die Proteinbiosynthese nötig sind: die damals so genannte "lösliche" RNA. Ihre Bedeutung wurde bald erkannt.

Crick hatte 1955 (7) 20 Adaptormoleküle postuliert, deren Aufgabe es sei, die Nukleotidschrift "colinear" in die Aminosäureschrift übersetzen zu helfen. Sie sollten einerseits an bestimmte Nukleotidsequenzen der Matrizen-RNA spezifisch gebunden werden, andererseits die Aminosäuren energiereich binden. Die Fraktion der "löslichen" RNA zeigte die von Crick postulierten Eigenschaften. Deshalb setzte sich der auf ihre Übersetzer-Funktion Bezug nehmende Name Transfer-RNA (tRNA) für diese Nukleinsäuren durch.

1965 und 1966 wurden die ersten vollständigen Basensequenzen von tRNAs bekannt (8, 9). Inzwischen sind schon über 50 tRNAs sequenziert worden. In allen tRNAs folgen die Basen einander in der Weise, daß die jeweils 75 bis 87 Nukleotide im zweidimensionalen sogenannten Kleeblattmodell angeordnet werden können (Abb. 1). Aufgrund ihrer Stabilität dürfte die Kleeblattstruktur das Grundelement auch der Raumstruktur der tRNAs bilden (z. B. 10). Jede tRNA besitzt eine Anticodon-Schleife. Diese enthält drei Basen, die den Basen eines Codons komplementär sind. Am -C-C-A-Ende der tRNA kann die diesem Codon entsprechende Aminosäure akzeptiert werden. Die Aminosäuren

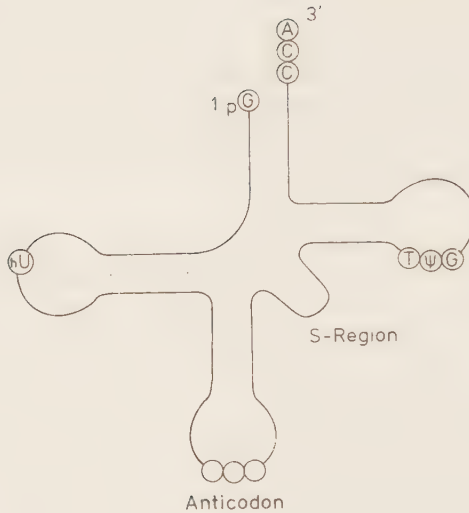


Abb. 1 Kleeblattschema der tRNA

Die Nukleotide werden vom 5'-terminalen Guanotin zum 3'-terminalen Adenosin durchgezählt. Die Stamm- und Schleifenregionen werden in der angegebenen Weise bezeichnet. Die Aminosäure wird auf das 3'-terminale Adenosin übertragen.

werden am Ribosom auf die wachsende Peptidkette in der Reihenfolge übertragen, wie die Codons in der Matrizen-RNA aufeinanderfolgen. An dieser Stelle sei eine ausführliche Übersicht erwähnt, die als Einführung ins Forschungsgebiet der tRNA dienen kann (11).

In allen bisher bekannten Fällen wurde der Befund (12) bestätigt, daß dieselben Enzyme, die die Aminosäuren aktivieren, die aktivierte Aminosäure auch auf die tRNA übertragen. Deshalb wurden die "aktivierenden" Enzyme bald allgemein Aminoacyl-tRNA-Synthetasen genannt. Diese Bezeichnung wird auch in der vorliegenden Arbeit verwen-

det. Bei der Lektüre von Sammelreferaten über Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (z. B. 6, 13) kann man bemerken, daß an Struktureigenschaften und an der Funktionsweise der verschiedenen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen kaum Gemeinsamkeiten hervorgehoben werden. Die Molekulargewichte betragen von 40 000 (14) bis 260 000 (15), es wurden neben monomeren Enzymen di- und tetramere mit gleichen und verschiedenen Untereinheiten beschrieben. Die Umsatzzahlen für den ATP-PP_i-Austausch bzw. die tRNA-Beladungsgeschwindigkeit variieren von 100 (16) bis 13 000 (17) bzw. von 50 (18) bis 640 (12) pro Minute. Ob die Aktivierung und der Transfer der Aminosäure in einem Reaktionsschnitt "konzertiert" (20), oder in mehreren getrennten Reaktionsschritten (21) abläuft, konnte nicht allgemein entschieden werden. Was den chemischen Reaktionsablauf betrifft, ist der Hypothese der Basenkatalyse (22) nicht widersprochen. Die Wirkungen verschiedener ein- und zweiwertiger Kationen, sowie von SH-Reagentien wurden an mehreren Synthetasen genau untersucht, allerdings mit unterschiedlichen Ergebnissen. Selbst in einunddemselben Organismus scheinen verschiedene Synthetasen optimal nicht unter den gleichen äußeren Bedingungen zu arbeiten (23).

Möglicherweise kommt die hohe Spezifität der tRNA-Aminoacylierung (24, 25) bei jeder Synthetase auf andere Weise zustande. Sicher reichen die bislang vorliegenden Daten (von etwa 30 Synthetasen aus verschiedenen Organismen) noch nicht für eine Übersicht über die Gemeinsamkeiten in Funktionsweise und Struktur dieser Enzyme aus.

Die Wechselwirkungen zwischen tRNAs und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sind interessant und von biologischer Bedeutung: Da bei der Knüpfung der Peptidbindung am Ribosom nicht kontrolliert wird, ob die tRNA auch die richtige Aminosäure trägt (27), bestimmen also Wechselwirkungen zwischen tRNA und Synthetase die Zuordnung der Aminosäure zur tRNA. Stabilität, Spezifität und Effektivität aller Enzyme, und damit die Überlebensfähigkeit der Zelle, können durch die Präzision dieses Zuordnungsmechanismus begrenzt werden. tRNAs haben Molekulargewichte von 25 000 bis 30 000. Makromoleküle dieser Größe sind der Bearbeitung mit physikalischen, chemischen und biochemischen Methoden gut zugänglich. tRNA und Aminoacyl-tRNA-

Synthetase sind deshalb auch für die Untersuchung spezifischer Wechselwirkungen zwischen Nukleinsäuren und Protein ein sehr geeignetes Modellsystem. Wechselwirkungen zwischen Nukleinsäuren und Proteinen spielen an mehreren Stellen des Zellstoffwechsels, insbesondere bei der Stoffwechselregulation, eine wichtige Rolle.

Man hat die Sequenzen der analysierten tRNAs mit einander verglichen, tRNAs spezifisch modifiziert und gespalten. Die modifizierten tRNAs, die Spaltungsprodukte, sowie Fragmentkombinationen sind auf ihre Beladbarkeit mit Aminosäure und auf ihre Fähigkeit, die Beladung anderer tRNAs zu hemmen, getestet worden. Es wurden Hypothesen aufgestellt, Argumente gesammelt, Begriffe gebildet: Bei mehreren oder allen tRNAs gleiche Regionen, wie die 3'-terminalen Basen - C-C-A, können sogenannte unspezifische Bindungsregionen darstellen. Welcher Art sind die sogenannten Erkennungsregionen, an der das Synthetasemolekül die Aminosäurespezifität der ihm zugeordneten tRNA erkennt? Die spezifische Erkennungsregion könnte im "Stamm" des Kleeblatts, im Anticodon, in der hU-Schleife, in der S-Region liegen, vielleicht spielen die seltenen Nukleotide eine Hauptrolle bei der Erkennung, vielleicht allgemein purinreiche Sequenzabschnitte (27). Möglicherweise auch besteht die Erkennungsregion aus Nukleotiden, die in der Sequenz weit voneinander entfernt liegen (28). Gute Übersicht über die interessante Diskussion dieser Fragen gibt (11).

Mit der Unterscheidung zwischen Bindungs- und Erkennungsregion wird nicht ein Begriff aus Thermodynamik und physikalischer Chemie einem der Informationstheorie entlehnten Begriff als Gegensatz gegenübergestellt - so verstanden würden die beiden Begriffe nur verschiedene Aspekte der Wechselwirkungen am selben Ort bezeichnen. Als Erkennungsregion einer tRNA wird im gebräuchlichen Sinn vielmehr eine mutmaßliche Bindungsregion bezeichnet, die einer einzigen bestimmten Synthetase die Aminoacylierung "erlaubt".

Welcher Art Resultate enzymkinetische Versuche in Verbindung mit Sequenzanalysen gestatten, sei am Beispiel von Untersuchungen über die Wechselwirkungen zwischen tRNA^{Phe} und Phenylalanyl-tRNA-

Synthetase (PRS) aus *Escherichia coli* angedeutet (29, 30, 31): Man stellte aus verschiedenen Organismen eine größere Anzahl tRNAs verschiedener Aminosäurespezifität rein dar, und konnte dann beobachten, daß diejenigen tRNAs von PRS beladen wurden, die mit tRNA^{Phe} aus *E. coli* in der Größe der hU-Schleife, der Basensequenz des hU-Stammes oder der 4. Base vom 3'-Terminus aus, oder mehreren dieser Kriterien übereinstimmten. Die Beschaffenheit von Anticodon-Stamm und -Schleife, der S-Region und von T- -G-Stamm und -Schleife schien für die Beladbarkeit kaum eine Rolle zu spielen.

Untersucht man die Wechselwirkungen zwischen Synthetase und tRNA mit Hilfe der Reaktionskinetik, so sind alle Interaktionen, die nicht zur Reaktion führen, dem Blick entzogen. Dies erschwert die chemische Charakterisierung der Wechselwirkungen sehr. Da die Reaktion kompliziert und der Reaktionsmechanismus noch in keinem Fall völlig verstanden ist, kann für Einflüsse von seiten der Cosubstrate der tRNA nicht quantitativ korrigiert werden. Mit Hilfe von Meßverfahren für Bindungsvorgänge können die physikalischen Parameter der Wechselwirkungen: Anzahl Bindungsstellen (im folgenden: n), Assoziations-, Gleichgewichtskonstante (im folgenden: K) und eventuell Geschwindigkeitskonstanten der Bindung (unter verschiedenen Bedingungen direkt gemessen werden. Damit wird eine Charakterisierung der Wechselwirkungen nach chemischen Gesichtspunkten möglich. Dies dürfte einen wesentlichen Schritt zum Verständnis der Aminoacylierungsreaktion und der Reaktionsspezifität zulassen. Allerdings muß im Auge behalten werden, daß auch Wechselwirkungen gemessen werden können, die für die Reaktion von geringer Bedeutung sind. Sequenzanalysen, Modifizierungen, Spaltungen der tRNAs und Untersuchung der Reaktionskinetik der Aminoacylierung hatten je für sich wichtige Ergebnisse gebracht, die koordinierte Anwendung dieser Methoden ermöglichte einen weiteren wesentlichen Wissenszuwachs. Für die Meßmethoden der Bindung ist eine analoge Entwicklung anzunehmen.

Bindung zwischen tRNA und Synthetasen zu messen ist auf verschiedenen Wegen versucht worden. Säulenchromatografische Methoden (z. B. 32) und Ultrazentrifugierung (z. B. 33) sind vor allem dazu benutzt worden, zu zeigen, unter welchen Bedingungen tRNA und Synthetase

stabile Komplexe bilden. Mit Hilfe von Ultrazentrifugierung hat man auch Assoziationskonstanten und die Anzahl Bindungsstellen abzuschätzen versucht (34). Bei der Methode nach Yarus und Berg (35) wird die Synthetase auf Nitrozellulosefilter adsorbiert. Diese Methode erlaubt über die Gleichgewichtsparameter hinaus sogar in gewissem Ausmaß Geschwindigkeitskonstanten zu messen (36).

Gegenüber anderen Methoden zur Bindungsmessung zeichnen sich Fluoreszenzmethoden durch einige Vorteile aus: Der Meßvorgang stört das System praktisch nicht. Synthetase und tRNA können in Lösung belassen werden, die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Mediums können frei variiert werden. Fluoreszenzeigenschaften von Atomen und Molekülen werden in der Physik seit langem untersucht; so sind Meßgeräte entwickelt, die sehr präzise selbst außerordentlich rasche Signaländerungen registrieren, und einige Zusammenhänge zwischen Meßgrößen und physikalisch-chemischen Vorgängen sind geklärt und mathematisch formuliert (Übersicht in (37)). Selbst bei Fluorophorkonzentrationen von kleiner als 10^{-7} M sind genaue Messungen möglich.

Da für die Wechselwirkungen zwischen tRNAs und Synthetasen Michaelis- und Dissoziationskonstanten im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-8} M gefunden worden waren, erschien eine Untersuchung der Bindung mit Hilfe der Tryptophanfluoreszenz der Synthetasen aussichtsreich. In den letzten Jahren sind über verschiedene Synthetasen Ergebnisse aus Fluoreszenzuntersuchungen publiziert worden (48 - 51).

Für die vorliegende Untersuchung standen gereinigte Seryl-tRNA-Synthetase (SRS) und Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (PRS), sowie reine tRNA^{Ser}, tRNA^{Phe} und bestimmte tRNA-Fragmente aus Hefe zur Verfügung, außerdem ein neu entwickeltes Spektrofluorimeter (52). Mit Hilfe der Tryptophanfluoreszenz der Synthetasen sollte versucht werden zu bestimmen, wieviele Bindungsplätze für tRNAs die Synthetasen besitzen und wie groß die Stabilitätskonstanten der Komplexe von tRNA und Synthetase sind. Weiterhin war die Bindung der tRNA-Fragmente an Synthetase zu untersuchen. 1971 gelang es Wintermeyer und Zachau (53), fluoreszierende Basen spezifisch an tRNA^{Ser} und

tRNA^{Phe} zu binden. Die Bindungseigenschaften dieser modifizierten tRNAs sollten mit denen nicht modifizierter verglichen werden. Die Fluoreszenzeigenschaften der modifizierten tRNAs sollten zur Messung benutzt werden.

2. Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen tRNAs und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen mit Hilfe der Tryptophanfluoreszenz der Synthetasen

Etwa zur Zeit, als die Nukleotidsequenz von tRNA^{Ser} aus Hefe bekannt wurde (9), gelang es Makman und Cantoni, SRS aus Hefe hoch anzureichern und zu charakterisieren (54, 55). In den letzten Jahren wurden neue Isolierungsverfahren für SRS entwickelt (49, 56, 57), verschiedene Eigenschaften dieses Enzyms wurden untersucht.

SRS ist ein dimeres Protein mit identischen Untereinheiten. Als Molekulargewicht werden 89 000 bis 120 000 d angenommen. Nach verschiedenen Autoren enthält SRS 8 bis 9 (55) oder 11 bis 12 (56) Tryptophanreste. Heider et al. (56) vermuteten, daß das Enzym leicht in enzymatisch inaktive Untereinheiten dissoziiert. Als maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurden 50 tRNA-Aminoacylierungen pro Enzym und Minute gemessen, die Michaeliskonstante K betrug für SRS und tRNA^{Ser} 0.24 μ M (55); ähnliche Werte wurden auch von anderen mitgeteilt (59, 60). Hertz und Zachau (60) fanden darüber hinaus, daß der Aminoacylierungsmechanismus möglicherweise kooperative Wechselwirkungen zwischen SRS und ATP bzw. L-Serin enthält.

In diesem Abschnitt werden Ergebnisse über die Bindung von tRNA^{Ser} an SRS mitgeteilt. In Anbetracht der bereits bekannten Daten lag es nahe, nach Zusammenhängen zwischen Reaktionsgeschwindigkeit, Michaeliskonstante, Assoziationsgrad der Synthetase einerseits und den Parametern der Bindung: Assoziationskonstante (K) und Anzahl Bindungsstellen (n) andererseits zu fragen. Dementsprechend wurde die Bindung zwischen Synthetase und tRNA in Gegenwart verschiedener Salz und Salzkonzentrationen, in Phosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten der Lösung, in Puffern mit und ohne MgCl₂ und bei verschie-

denen SRS-Konzentrationen untersucht. Um die Spezifität der Wechselwirkungen zu kontrollieren, wurden auch die Bindungsgleichgewichte zwischen den Synthetasen und den nicht-homologen tRNAs gemessen.

Als Meßgröße wurde die Tryptophanfluoreszenz der Synthetasen benutzt. Die Synthetase wurde mit tRNA titriert: In einer Quarzküvette befand sich, in bestimmter Konzentration, der fluoreszierende Titrand, die Synthetase. Der Ligand, tRNA, wurde in kleinen Schritten zugesetzt. Nach jedem Zusatz wurde die Lösung gemischt; die Synthetasefluoreszenz, die Transmission der Lösung und die Intensität des Anregungslichts wurden gemessen. Die tRNA trägt selbst nicht zum Meßwert der Fluoreszenz bei, kann aber die Fluoreszenzeigenschaften der Synthetase verändern, wenn Wechselwirkungen zwischen beiden Substanzen stattfinden. Damit sich die Titrandkonzentration in der Küvette während der Titration nicht änderte, enthielt die tRNA-Lösung dieselbe Synthetasekonzentration wie der Küvetteninhalt; auf diese Weise zutitrieren gestattet eine übersichtlichere Auswertung.

Da PRS bei tRNA-Bindung nur geringe Fluoreszenzänderungen zeigte, sind die Resultate aus Titrationen mit SRS in diesem Abschnitt in den Vordergrund gerückt.

2.1. Einfluß des Titrationsvorgangs auf Fluoreszenz und Aktivität der Synthetase. Kontrollen zur Methode

Absorptions- und Fluoreszenzanregungsmaxima von SRS und PRS liegen in neutraler wäßriger Lösung bei 280 nm (44 , und eigene Spektren) die Fluoreszenzemissionsmaxima bei 340 nm Wellenlänge.

In ersten Experimenten wurde beobachtet, daß durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 280 nm die Fluoreszenzintensität der SRS abnahm. Doch war es möglich ausreichend genau noch mit so geringer Beleuchtungsstärke zu messen, daß die Fluoreszenzintensität der Synthetase um weniger als 4 - 5 % pro Stunde abnahm. Im Verlauf eines typischen Titrationsexperiments mußte die Synthetase 10 bis 15 Minuten bestrahlt werden. Für den entsprechenden Verlust an Fluoreszenzintensität von etwa 1 % während einer Titration wurde nicht korrigiert. Nach

Bestrahlungspausen von mehreren Minuten war die Fluoreszenzintensität jeweils wieder etwas angestiegen, erreichte jedoch auch nach längeren Pausen nicht mehr das Ausgangsniveau.

Erst unter intensiver Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 280 nm verringerte sich auch die enzymatische Aktivität von SRS merklich (siehe Abb. 2). Nach drei Stunden Bestrahlungsdauer waren noch etwa 50 % der Aktivität erhalten. Die Lichtmenge einer durchschnittlichen Titration entspricht einer Bestrahlungsdauer mit der für Abb. 2 verwendeten Intensität von etwa 2 Minuten. Die Beladungsaktivität der Synthetasen wurde routinemäßig vor und nach der Titration getestet. Ein Vergleich über alle Tests ergab einen Aktivitätsverlust von etwa 10 %. Die berechneten Enzymkonzentrationen wurden für diese Änderung nicht korrigiert.

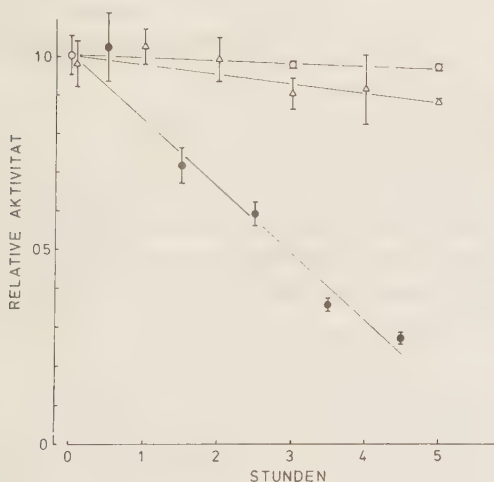


Abb. 2 Aktivität von SRS bei Bestrahlung mit ultravioletttem Licht

Die SRS-Aktivität wurde im Standardtest bestimmt, nachdem die Lösungen für die angegebene Zeit gehalten waren: (○) im Eiswasserbad, (△) bei 25° C, (●) bei 5° C unter kontinuierlicher Bestrahlung mit Licht von 280 nm Wellenlänge, dessen Intensität etwa 20mal größer als bei Titrationen war. Eingezeichnet sind die Standardabweichungen.

Mit Hilfe einer einfachen Vorrichtung, die im Abschnitt "Durchführung der Titrationsen" (6.2.) genauer beschrieben ist, konnte erreicht werden, daß sich durch Zugabe von Lösung und Mischen in der Küvette weder die Fluoreszenzausbeute noch das Titrationsvolumen unerwünscht änderten. Daß die Fluoreszenzintensität von SRS sich durch Mischen verringern kann, wurde auch von Engel et al. (44) beobachtet.

2.2. Auswertung der Fluoreszenztitrationsen

Zur Auswertung der Gleichgewichtstitrationen wurde ein Wechselwirkungsmodell benutzt, in dem am Enzym eine Klasse gleicher und nicht aufeinander einwirkender Bindungsplätze angenommen wird. Dafür gilt, wenn (SR) die Konzentration der an Enzym-Bindungsstellen gebundenen tRNA (S_0) die eingesetzte Konzentration an Synthetase-molekülen und (R_0) die eingesetzte Konzentration an tRNA sind, folgende Beziehung:

$$K = \frac{(SR)}{[n(S_0) - (SR)][(R_0) - (SR)]} \quad 2.2./1$$

n bedeutet die Anzahl Bindungsplätze an der Synthetase für tRNAs und K die Assoziationskonstante. (Synonym zu Assoziationskonstante werden "Gleichgewichts-", "Bindungs-" und "Stabilitätskonstante" verwendet. Der qualitative Begriff "Bindungsstärke" kann durch die entsprechende Bindungskonstante quantitativ beschrieben werden.)

Für das Verhältnis von Fluoreszenzintensität I und Bindungsgrad der Synthetase α_S wurde vorausgesetzt:

$$\alpha_S = \frac{I - I_0}{I_\infty - I_0} = \frac{(SR)}{n(S_0)} \quad 2.2./2$$

I_0 bedeutet Fluoreszenzintensität der freien Synthetase und I_{∞} Fluoreszenzintensität des Synthetase-tRNA-Komplexes. Einsetzen von Gleichung 2.2./2 in 2.2./1 ergibt:

$$\alpha_S = \frac{(R_0) + n(S_0) + 1/K - \sqrt{[(R_0) + n(S_0) + 1/K]^2 - 4n(S_0)(R_0)}}{2n(S_0)} \quad 2.2./3$$

Sollte bei Titrationen fluoreszierender tRNAs mit Synthetase der Bindungsgrad der tRNA, α_R , aus der Anisotropie r bestimmt werden, so galt nach (41 b):

$$\alpha_R = \frac{1}{I_0} \cdot \frac{r - r_{\infty}}{r_{\infty} - r_0} + 1 \quad 2.2./4$$

r_0 und r_{∞} bezeichnen die Anisotropiewerte der freien tRNA und des Komplexes aus tRNA und Synthetase.

Der Ausdruck 2.2./3 ist für die Computeranpassungen benutzt worden (hierzu siehe Abschn. 5.1.).

2.3. Abhängigkeit des Bindungsgleichgewichts von tRNA^{Ser} und SRS von den Pufferbedingungen

2.3.1. Einfluß verschiedener Salze

In diesem Abschnitt werden Ergebnisse aus Fluoreszenztitrationen von SRS mit tRNA^{Ser} und tRNA^{Phe} in Gegenwart und Abwesenheit verschiedener Salze mitgeteilt und zu Bestimmungen der biologischen Aktivität in Beziehung gesetzt. Außer Kaliumchlorid, dessen Wirkung als unspezifische Abschirmung von Ladungen verstanden werden kann, wurden Guanidinium- und Magnesiumchlorid eingesetzt. Guanidiniumchlorid benutzt man in Konzentrationen bis etwa 1 M, um oligomere Proteine in Untereinheiten zu dissoziieren. Anwesenheit von $MgCl_2$ stabilisiert die biologisch aktive dreidimensionale Struktur von tRNA.

Die relative Fluoreszenzintensität von SRS allein wurde in Phosphat- und Cacodylatpuffer bei verschiedenen KCl-Konzentrationen gemessen und war bis 1.2 M KCl unverändert.

Durch Sättigung der Synthetase mit tRNA wurde die relative Fluoreszenz von SRS monoton umso weniger gelöscht, je höher die Ionenstärke (im folgenden: μ) war. Durch tRNA^{Ser} wurden im Cacodylatpuffer etwa 25 % der SRS-Fluoreszenz gelöscht, in Gegenwart von zusätzlich 0.3 M KCl, 0.1 M K_2SO_4 oder 0.1 M $(NH_4)_2SO_4$ nur zwischen 6 und

10 %. Die durch Sättigung mit tRNA^{Phe} verursachte Löschung der SRS-Fluoreszenz zeigte eine ähnliche Abhängigkeit von der Salzkonzentration (vgl. Abb. 3). Bei entsprechenden Titrationen im Phosphatpuffer waren die Fluoreszenzänderungen im untersuchten Ionenstärkebereich jeweils etwas geringer.

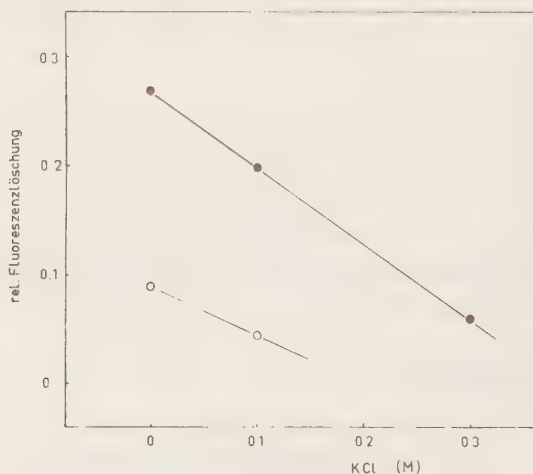


Abb. 3 Maximale Löschung der SRS-Fluoreszenz durch tRNA^{Ser} (●) und tRNA^{Phe} (○) in Cacodylatpuffer, 25° C, bei verschiedenen KCl-Konzentrationen

SRS (0.3 bis 0.4×10^{-6} M) wurde mit tRNA titriert. Aufgetragen wurden Ergebnisse aus Computeranpassungen.

Bei Erhöhung der Ionenstärke des Puffers (0.1 M) durch KCl auf etwa 0.3 M im Cacodylatpuffer verringerte sich die Assoziationskonstante für SRS und tRNA^{Ser} von über 10^8 M^{-1} auf etwa 10^7 M^{-1} . Im Phosphatpuffer nahm sie gleich stark ab, war aber deutlich geringer. Die Affinität von SRS für tRNA^{Phe} schwächte sich mit steigender Ionenstärke ebenfalls stark ab. Die durch Anpassungen erhaltenen Werte für die Anzahl Bindungsplätze für sowohl tRNA^{Ser} als auch tRNA^{Phe} an SRS betrug bei $\mu = 0.1$ M etwa 2 und bei $\mu = 0.3$ etwa 1. Die Resultate der Computeranpassungen der Bindungsparameter für das Gleichgewicht

von SRS und tRNA^{Phe} enthielten aufgrund der geringen Fluoreszenz-änderungen relativ große Unsicherheit.

Die Ionenstärke im Gemisch des Standard-Aminoacylierungstests beträgt etwa 0.1 M. Damit ist sie gleich hoch wie die Ionenstärke der Titrationspuffer. Die Beladungsgeschwindigkeit der tRNA^{Ser} zeigte bei $u = 0.1$ M etwa 50 % des maximalen Wertes, erreichte das Maximum bei $u = 0.25$ M und sank bei noch höheren Ionenstärken asymptotisch gegen Null ab (siehe Abb. 4). Verschiedene SRS-Präparate zeigten geringe Variation in der Lage des Maximums. Die monotone Verringerung tRNA-bedingter Löschung der SRS-Fluoreszenz mit steigender Ionenstärke hatte dieses Verhalten nicht erwarten lassen. Jedoch konnte eine, wie die durchgezogene Linie in Abb. 4 zeigt, auch quantitativ hinreichende Deutung der Abhängigkeit der SRS-Aktivität von der Ionenstärke aus weiteren Befunden über den Komplex von Synthetase und tRNA hergeleitet werden. Hierzu siehe den Abschnitt 5.2.4..

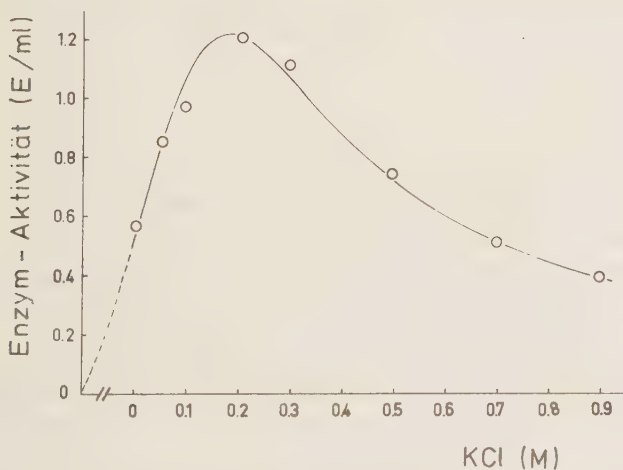


Abb. 4 Abhängigkeit der SRS-Aktivität von der KCl-Konzentration im Puffer

Standardtest bei 25° C, kein Albuminzusatz. SRS-Konzentration im Test 0.6×10^{-7} M. Die durchgezogene Linie wurde nach einer Formel erhalten, die in Abschn. 5.2.4. hergeleitet ist.

Die Fluoreszenzintensität von SRS allein wurde durch Guanidiniumchlorid etwa proportional zur Guanidiniumchlorid-Konzentration verringert. In Gegenwart von 0.1 M nahm die SRS-Fluoreszenz um weniger als 5 %, von 0.4 M um etwa 10 % ab, in Gegenwart von 1 und 2 M Guanidiniumchlorid um 30 bzw. etwas mehr als 50 %. In Gegenwart von 0.1 M und höheren Konzentrationen an Guanidiniumchlorid zeigte SRS keine Beladungsaktivität mehr. SRS im Komplex mit tRNA^{Ser} fluoreszierte in Gegenwart von 0.1 und 0.4 M Guanidiniumchlorid 22 und 11 % schwächer als freie SRS. Die Stabilitätskonstanten für den Komplex aus SRS und tRNA^{Ser} in Kalium- und Guanidiniumchlorid waren ungefähr gleich groß.

tRNA^{Ser} konnte also unter Bedingungen, die keine Aminoacylierung zuließen, die Fluoreszenz von SRS ähnlich stark löschen wie in 0.1 und 0.3 M KCl, in dessen Gegenwart tRNA^{Ser} schneller beladen wurde als im Standardtest ohne Salz. Ob nun Guanidiniumchlorid Konformationsänderungen, Dissoziation oder beides an SRS verursachte, das Bindungsgleichgewicht wurde durch Guanidiniumchlorid nicht anders beeinflußt als durch KCl.

In Phosphatpuffer ohne Magnesiumchlorid blieb, in Übereinstimmung mit Resultaten aus (49), die relative Fluoreszenzintensität von SRS bei tRNA^{Ser} -Zusatz konstant (siehe Abb. 5). Doch wurde tRNA^{Ser} auch in Abwesenheit von MgCl_2 an SRS gebunden, wie Titrations, in denen die Immobilisierung von tRNA^{Ser} -EBred an SRS gemessen wurde, zeigten (siehe Abschnitt 3.3.3.). Die Beladungsgeschwindigkeit von SRS liegt nach (55) in Abwesenheit von MgCl_2 unter der Nachweisgrenze. (Bei eigenen, vorläufigen Experimenten lag die Beladungsgeschwindigkeit unter 5 % der Standardaktivität).

Die Aussagen dieses Abschnitts über Fluoreszenz und Aktivität von SRS lassen sich wie folgt zusammenfassen: unter den Bedingungen, unter denen tRNA^{Ser} beladen werden könnte, fanden spezifische, mit Löschung von SRS-Fluoreszenz verbundene Wechselwirkungen der tRNA mit der Synthetase statt. SRS-Fluoreszenz konnte durch tRNA auch unter Bedingungen gelöscht werden, unter denen keine Aminoacylierung erfolgte. tRNA kann sich an SRS binden, ohne daß die Fluor-

essenzenz der Synthetase verändert würde.

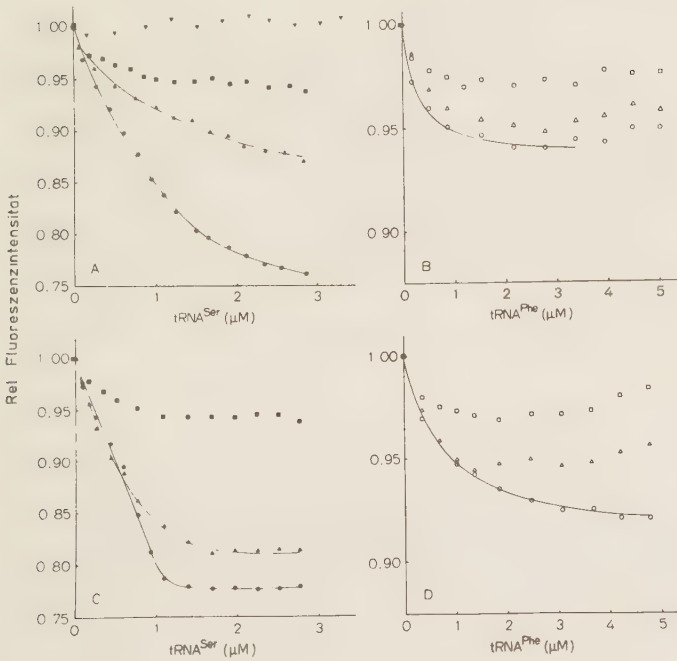


Abb. 5 Titrationen von SRS (0.35×10^{-6} M) mit tRNA^{Ser} (ausgefüllte Symbole) und tRNA^{Phe} (leere Symbole) in Phosphatpuffer (A, B) und Cacodylatpuffer (C, D) bei 25° C

(○, ●) Puffer, (△, ▲) Puffer + 0.1 M KCl, (□, ■) Puffer + 0.3 M KCl, (▼) Puffer, jedoch ohne MgCl₂. Die durchgezogenen Linien entsprechen Computeranpassungen.

2.3.2. Einfluß des pH-Werts der Lösung

In neutraler Lösung liegen die Phosphatgruppen des tRNA-Moleküls überwiegend in ionisierter Form vor. Für die Bindung von tRNA an Synthetasen spielen Ladungen und der pH-Wert der Lösung eine wich-

tige Rolle (z. B. 61 - 63). Die Bindungsgleichgewichte von SRS mit tRNA^{Ser} und tRNA^{Phe} wurden im Cacodylat- und im Phosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten untersucht.

Die Fluoreszenz von SRS allein nahm im Phosphatpuffer zwischen pH 5.6 und 8.0 mit steigendem pH-Wert der Lösung um etwas mehr als 10 % ab (vgl. hierzu Abb. 6). Die Dissoziationskurve des einfach geladenen Phosphatanions ($\text{pK} = 7.2$) verläuft dazu völlig parallel (zweite Linie von oben in Abb. 6B). Ein enger Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzlöschung und der Konzentration an sekundärem Phosphat ist auch deshalb anzunehmen, weil sich die Fluoreszenz von SRS in Cacodylatpuffer zwischen pH 5.6 und 8.0 nicht änderte. Je größer der Anteil sekundären Phosphats war, desto stärker war die SRS-Fluoreszenz gelöscht.

Das Ausmaß der Löschung der SRS-Fluoreszenz durch tRNA^{Ser} und tRNA^{Phe} im Phosphatpuffer war umso geringer, je höher der pH-Wert der Lösung war. Wurde die relative Fluoreszenz freier SRS beim entsprechenden pH-Wert jeweils als Bezugspunkt benutzt, so zeigte sich, daß die durch Wechselwirkung mit tRNA hervorgerufene Löschung der SRS-Fluoreszenz aus zwei Anteilen bestand: 12 % der Gesamtfluoreszenz konnten durch anorganisches sekundäres Phosphat gelöscht werden. Ungefähr diesen Phosphat-labilen Anteil war auch die unspezifische tRNA^{Phe} in der Lage zu löschen. Weitere etwa 15 % konnten nicht durch anorganisches Phosphat gelöscht werden, auch nicht durch eine unspezifische tRNA. Dieser Teil wurde durch tRNA^{Ser} gelöscht.

Das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung durch tRNA variierte innerhalb enger Grenzen von SRS-Präparat zu SRS-Präparat. Die angegebenen Zahlenwerte und die Abbildungen entsprechen Versuchen mit derselben Fraktion.

Bei Titrationen von SRS mit tRNA^{Ser} und tRNA^{Phe} in Cacodylatpuffer bei pH 7.2 wurden durch die tRNAs wesentlich größere Anteile der SRS-Fluoreszenz gelöscht als im Phosphatpuffer bei pH 7.3. In Cacodylatpuffer nahm die Fluoreszenz freier SRS mit steigendem pH-Wert der Lösung nicht ab. Von dieser konstanten Fluoreszenzintensität aus-

gehend erreichte SRS im Komplex mit tRNA^{Ser} und tRNA^{Phe} in Cacodylatpuffer gleiche Fluoreszenzwerte wie im Phosphatpuffer (Abb. 6B).

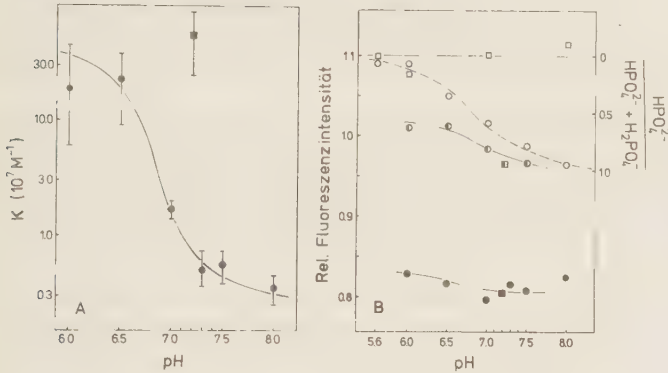


Abb. 6 Assoziationskonstanten (A) und relative Fluoreszenzintensitäten (B) in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung

(●, ■): Assoziationskonstanten für das Bindungsgleichgewicht von SRS mit tRNA^{Ser} (A) und relative Fluoreszenzintensität von SRS in Sättigung mit tRNA^{Ser} (B);

(●, ■): relative Fluoreszenzintensität von SRS in Sättigung mit tRNA^{Phe} ; (○, □): relative Fluoreszenzintensität von SRS in Abwesenheit von tRNA ($1.0 \pm$ in Phosphatpuffer bei pH 7.3);

(○, ●, ■): in Phosphatpuffer; (□, ■, ■): in Cacodylatpuffer;

(I): 95 %-Vertrauensbereiche;

Dissoziationsgleichgewicht von primärem und sekundärem anorganischem Phosphat (---) und relative Fluoreszenzintensität von SRS in Abwesenheit von tRNA verlaufen parallel.

Bei pH 6.0 im Phosphatpuffer ergab sich für die Bindung von SRS an tRNA^{Ser} eine Assoziationskonstante von $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, für die Bindung an tRNA^{Phe} $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Auch bei pH 7.3 unterschieden sich die Assoziationskonstanten um einen Faktor zwischen 5 und 10. Bei pH 8.0 war die Bindung von SRS an tRNA^{Ser} etwa 50mal schwächer als bei

pH 6.0, die Änderung der Bindungskonstante bei Änderung des pH-Werts war am stärksten im Bereich von pH 7.0. Die Bindungskonstante für SRS und tRNA^{Ser} im Cacodylatpuffer bei pH 7.2 lag bei $6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (quadratisches Symbol in Abb. 6A). Für die Abwesenheit sekundären Phosphats im Phosphatpuffer (pH 5.5) ließ sich ein ähnlicher Wert extrapolieren. Die Anzahl Bindungsplätze für tRNA^{Ser} an SRS betrug in beiden Puffern bei pH 5.6 vier, bei pH 8.0 zwei.

Die Bindung von tRNA an SRS wird also von einem Säure-Base-Gleichgewicht mit einem pK-Wert zwischen 7.0 und 7.5 beeinflusst. Möglicherweise kompetitieren sekundäre Phosphatanionen um unspezifische Bindungsplätze für tRNA an SRS.

2.3.3. Einfluß von Glycerin

In Gegenwart von Glycerin wird die Aktivität der meisten aus E-coli isolierten Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (64) und der in dieser Arbeit untersuchten Synthetasen (59c) geschützt. Deshalb wurde auch SRS und PRS in Puffern isoliert und aufbewahrt, die Glycerin enthielten. Wirkungen von Glycerin auf ein Protein sind an Aldehyddehydrogenase untersucht worden (65): Schutz von SH-Gruppen und geänderte Affinität zu Substraten durch Glycerin führten zur Vermutung, Glycerin verursache eine Konformationsänderung. Außerdem wurde durch Glycerinzugabe zum Puffer ein temperaturabhängiges Assoziationsgleichgewicht der monomer inaktiven Proteinuntereinheiten zugunsten der oligomeren aktiven Formen verschoben (66). Durch Erwärmung oder Glycerinzugabe wurde auch Prolyl-tRNA-Synthetase, die in der Kälte in die Untereinheiten zerfiel, zum aktiven Dimer reassoziert (67). Heider et al. (56) führten Ultrazentrifugierungen an SRS aus Bäckerhefe in Abwesenheit von Glycerin durch und diskutierten aufgrund der Ergebnisse Dissoziation in die beiden Untereinheiten.

Mit Hilfe von Fluoreszenztitrationsen wurde der Einfluß von Glycerin auf die Bindung von tRNA^{Ser} an SRS untersucht. Drei aliquote Teile einer konzentrierten SRS-Lösung wurden in drei Phosphatpuffer 40fach verdünnt, von denen einer 10 % Glycerin, der zweite 5 % Saccharose

und der dritte weder Glycerin noch Saccharose enthielt. Nach mehreren Stunden Inkubation bei 0°C wurden diese Synthetaselösungen mit tRNA^{Ser} titriert. In allen drei Fällen löschte die Bindung der tRNA etwa 21 % der SRS-Fluoreszenz, drei bis vier tRNA-Moleküle wurden gebunden. Als Stabilitätskonstante ergab sich für Gegenwart von 10 % Glycerin $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, für Gegenwart von 5 % Saccharose oder Abwesenheit von Glycerin und Saccharose $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$.

Die Assoziationskonstante für das Bindungsgleichgewicht von SRS und tRNA^{Ser} in Gegenwart von Glycerin war also nicht davon abhängig, ob dieses Präparat vor der Titration bei 0°C mehrere Stunden präinkubiert worden war. Wie in Abb. 2 gezeigt ist, änderte sich auch die Aktivität von SRS, die eine sehr empfindliche Meßgröße für den Zustand der Synthetase darstellt, in Gegenwart von Glycerin bei 0°C während fünf Stunden nicht. Worauf der Unterschied der Bindungskonstanten aus Titrationen in Gegenwart und Abwesenheit von Glycerin zurückzuführen ist, ist weiter zu klären. Deutliche Hinweise auf eine Dissoziation oder auch Konformationsänderung von SRS durch Glycerin konnten den Experimenten nicht entnommen werden.

2.4. Alterung von SRS

Die in Fluoreszenztitrationen untersuchten SRS-Fractionen zeigten nach der Präparation 1.8 bis 2.0 Bindungsstellen für tRNA. Dieser Wert erhöhte sich langsam. Nach fünf bis sechs Monaten konnten drei, ein Jahr nach der Präparation vier tRNA-Moleküle pro SRS gebunden werden. Diese Anzahl blieb dann, zumindest über mehrere Monate konstant. Ausmaß der Fluoreszenzlöschung und Assoziationskonstante variierten gering von Präparat zu Präparat, veränderten sich jedoch meist nicht merklich über die Zeit.

Kleine Volumina der Enzymlösungen wurden jeweils für sich eingefroren. So konnte vermieden werden, daß dieselbe Lösung oft aufgetaut und eingefroren werden mußte. Die Enzympräparate wurden bei -20°C und bei -80°C aufbewahrt. Stehen bei 0°C vor Titrationen kann möglicherweise auch die Struktur von SRS beeinflußt haben. Es

ist nicht ausgeschlossen, daß auch die Reinheit des Präparats, die Dauer der Isolierung und die Qualität der Hefe dafür eine Rolle spielten.

Man könnte sich vorstellen, daß sich die Tertiärstruktur von SRS mit der Zeit geringfügig ändert. Zusätzliche Ladungen an der Enzymoberfläche würden Wechselwirkungen mit mehr tRNA-Molekülen erlauben. Die Fluoreszenzeigenschaften von SRS brauchten sich dadurch nicht zu ändern. Der Befund, daß die n -Werte bei Erhöhung der Ionenstärke kleiner wurden, spricht für eine solche Annahme zusätzlicher unspezifischer elektrostatischer Wechselwirkungen. Allerdings hängt die aus den Anpassungen erhaltene Anzahl Bindungsplätze auch davon ab, ob meßbare Anteile der Synthetase in Zuständen vorlagen, die in das Anpassungsmodell nicht einbezogen waren. SRS brauchte nicht nur in einer freien und stark fluoreszierenden Form oder in einer schwächer fluoreszierenden, tRNA-gebundenen Form vorzuliegen: Daß tRNA an SRS gebunden sein konnte, ohne die SRS-Fluoreszenz zu mindern, ergab sich aus SRS-Titrationen in Abwesenheit von $MgCl_2$. Die Fluoreszenzintensität freier SRS variierte mit dem pH-Wert des Phosphatpuffers. Auch der Befund, daß das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung und die scheinbare Anzahl Bindungsstellen von der Ionenstärke abhingen, stützt die Annahme, daß unter verschiedenen Bedingungen mehrere verschiedene fluoreszierende Formen freier und tRNA-gebundener SRS vorliegen konnten.

2.5. Titrationen bei verschiedenen Temperaturen

SRS wurde bei Temperaturen zwischen 5 und 25° C mit tRNA^{Ser} titriert. Die Fluoreszenz wurde durch tRNA bei allen Temperaturen etwa im gleichen Ausmaß gelöscht. Je höher die Titrationstemperatur, desto weniger Bindungsplätze für tRNA zeigte SRS. Mit steigender Temperatur nahm auch die Bindungskonstante ab. Die Größe dieser Effekte schien abhängig von der SRS-Konzentration.

In Titrationen mit tRNA^{Ser} bei 5 bis 15° C zeigte SRS sigmoide Bindungskurven (siehe Abb. 7). Die Sigmoidität war nicht in allen Versuchen identisch reproduzierbar. Die oben genannten Aussagen über n -

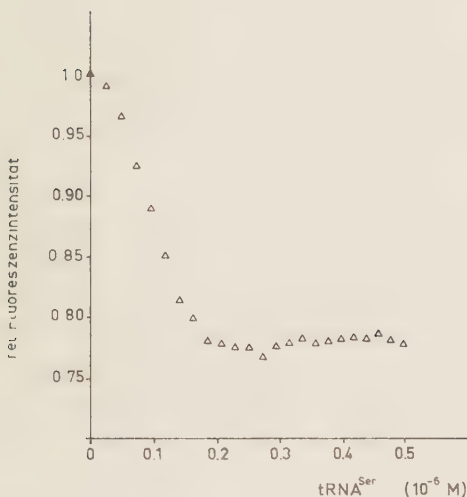


Abb. 7 Titration von SRS mit tRNA^{Ser}

in Phosphatpuffer bei 4.6° C. SRS 0.8×10^{-7} M

und K-Werte wurden aus Anpassungen an nicht sigmoide Bindungskurven gewonnen. SRS-Titrationsen mit tRNA^{Phe} unter denselben Bedingungen ergaben keine sigmoide Bindungskurven.

Die Bindung von tRNA^{Ser} an SRS war bei niedrigen Temperaturen begünstigt. Dafür sprechen auch Ergebnisse aus Temperatursprung-Experimenten (40).

2.6. Titrationsen bei verschiedenen SRS-Konzentrationen

SRS besaß in Konzentrationen über 0.5 μ M eine größere Anzahl apparater Bindungsstellen und eine größere Affinität für tRNA^{Ser} als in

geringer konzentrierter Lösung. Die Fluoreszenz wurde in konzentrierten SRS-Lösungen weniger stark gelöscht als in verdünnten Lösungen.

Die in dieser Arbeit untersuchte SRS - darauf deuten alle Befunde hin - hatte keine konstante Anzahl gleicher und voneinander unabhängiger tRNA-Bindungsplätze, von denen jeder die SRS-Fluoreszenz um den gleichen Betrag verminderte. Der Zusammenhang zwischen Fluoreszenzänderung und Bindung und der Mechanismus der tRNA-Bindung sind komplizierter. Zur Erklärung der pH-, Ionenstärke- und Altersabhängigkeit genügte es, für SRS Konformationsänderungen anzunehmen, die die Anzahl der Bindungsplätze verschieden hoch erscheinen ließen. Das für die Anpassungen von n und K zugrunde gelegte Modell konnte als ausreichende Annäherung an den tatsächlichen Bindungsmodus betrachtet werden. Die sigmoiden Bindungskurven, die in Titrationen bei niedrigen Temperaturen erhalten wurden, machen kooperative Wechselwirkungen zwischen SRS und tRNA^{Ser} wahrscheinlich. Daß die Bindungsparameter und das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung durch tRNA^{Ser} mit der SRS-Konzentration variierten, läßt sich am ehesten mit der Annahme eines Assoziationsgleichgewichts von SRS-Einheiten erklären. Es wäre also ein entsprechendes, kompliziertes Modell für die Wechselwirkungen von SRS mit tRNA^{Ser} zu formulieren. Über weitere Experimente zu dieser Frage wird in Abschnitt 4 berichtet.

Ähnlich wie der sogenannte Hill-Koeffizient sind jedoch auch die n - und K -Werte, die aus den Anpassungen hervorgingen, nicht ohne physikalische Bedeutung: Für Grenzbedingungen geben sie sogar quantitativ richtige Resultate.

2.7. Titrationsergebnisse mit PRS

Die Fluoreszenzänderungen von PRS auf tRNA-Zusatz hin waren relativ gering: tRNA^{Phe} löschte in Phosphatpuffer etwa 8 % der PRS-Fluoreszenz, und 11 % in Abwesenheit von MgCl₂ (siehe Abb. 8). Die Löschung der PRS-Fluoreszenz durch tRNA^{Phe} in Gegenwart von

0.15 M KCl betrug 4 bis 5 %. Sie war damit etwa gleichgroß wie die Löschung durch tRNA^{Ser} im Phosphatpuffer ohne Salzzusatz. In Gegenwart von 0.15 M KCl wurde die PRS-Fluoreszenz durch tRNA^{Ser} nicht meßbar gelöscht.

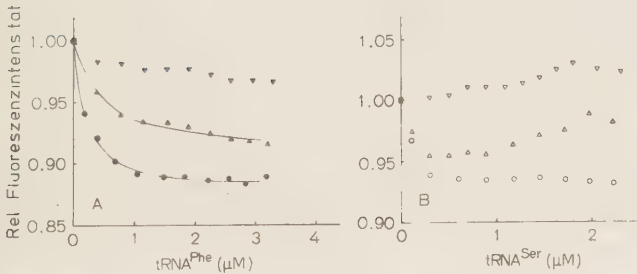


Abb. 8 Titrationen von PRS mit tRNA^{Phe} (A) und mit tRNA^{Ser} (B) in Phosphatpuffer bei 25° C

($\triangle$, $\blacktriangle$) Puffer, Synthetase 0.2×10^{-6} M; ($\circ$, $\bullet$) Puffer ohne MgCl_2 , Synthetase 0.2×10^{-6} M; (∇ , $\blacktriangledown$) Puffer + 0.15 M KCl, Synthetase 0.5×10^{-6} M.

Die Computeranpassungen für die Anzahl tRNA^{Phe} -Bindungsstellen an PRS ergaben Werte um 1. Die Stabilitätskonstante des PRS-Komplexes mit tRNA^{Phe} im Phosphatpuffer betrug $6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, im Phosphatpuffer ohne MgCl_2 $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Dieser Befund stimmt mit Ergebnissen aus Titrationen des Komplexes aus PRS und $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ mit MgCl_2 (Abb. 17, Abschnitt 3.2.3.) überein.

Bindungskonstanten, Fluoreszenzlöschung und MgCl_2 -Abhängigkeit der beiden untersuchten Synthetasen sollen im folgenden kurz verglichen werden.

PRS und SRS zeigten im Phosphatpuffer etwa gleiche Affinität zur spezifischen tRNA, mit Assoziationskonstanten um $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Werte dieser Größenordnung sind für Synthetasen und die jeweils spezifischen tRNAs bei gleichen Ionenstärken typisch (z. B. 38, 39, 44, 49 - 51).

Das SRS-Dimer besitzt etwa 10 Tryptophanreste (55, 56), unter Standardbedingungen können zwei tRNAs gebunden werden, und etwa ein Viertel der Fluoreszenz wird durch tRNA^{Ser} gelöscht. Dies entspricht weitgehender Löschung der Fluoreszenz (68, 69) von ein bis zwei Tryptophanresten pro gebundener tRNA. Das PRS-Tetramer enthält 16 Tryptophanreste (70), und tRNA^{Phe} löscht ein Zehntel bis Zwölftel der PRS-Fluoreszenz. Es wird also ebenfalls ein Anteil der Fluoreszenz gelöscht, der ein bis zwei Tryptophanresten entspricht. Auch mit Valyl-tRNA-Synthetase aus E-coli wurden ähnliche Ergebnisse erhalten (71). Das Fluoreszenzverhalten anderer Synthetasen (z. B. 43, 51a, 72) kann mit der Annahme, daß bei der Bindung einer tRNA an einen Bindungsplatz der Synthetase die Fluoreszenz von ein bis zwei Tryptophanresten gelöscht werden könne, nicht hinreichend erklärt werden.

Weglassen von MgCl_2 aus dem Phosphatpuffer hatte bei PRS und SRS verschiedene Auswirkungen auf die Affinität zu tRNA und das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung. Auch die Beweglichkeit der tRNAs im Komplex mit der Synthetase wurde durch MgCl_2 bei SRS und PRS unterschiedlich beeinflusst; über die Ergebnisse hierzu wird in Abschnitt 3.2.3. berichtet.

3. Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen tRNA und Aminoacyl-tRNA-Synthetase mit Hilfe von Fluorophor-markierter tRNA

Beobachtung der Intensität der Tryptophanfluoreszenz erlaubt Aussagen über freie und tRNA-gebundene Synthetase, wenn sich die Umgebung auch nur eines Tryptophanrests ändert. Dies kann durch Konformationsumwandlungen der Synthetase oder durch spezifische Wechselwirkungen der tRNA mit Tryptophanresten ausgelöst sein. Demgegenüber ändert sich die Fluoreszenzpolarisation eines geeigneten tRNA-Fluorophors, wenn sich innere und äußere Beweglichkeit der tRNA ändern. Fluoreszenzänderungen der Synthetase bei Bindung an tRNA und Änderungen der Beweglichkeit der tRNA im Komplex charakterisieren beide die Wechselwirkungen zwischen tRNA und Synthetase. Besonders nützlich war dies für Bedingungen, unter denen sich die Tryptophanfluoreszenz nur wenig änderte, wie bei den Titrationen von SRS mit tRNA^{Phe} und von PRS mit tRNA^{Ser} und mit tRNA^{Phe}.

3.1. Beweglichkeit und Polarisationsgrad des Fluorophors

Der Zusammenhang zwischen Polarisationsgrad bzw. Anisotropie und der Beweglichkeit des Fluorophors wird kurz erläutert, da sich die Ergebnisse der weiteren Teile dieses Kapitels darauf beziehen.

Bekanntlich kommt Fluoreszenz so zustande, daß von einem Molekül ein Photon aufgenommen wird - ein Elektron erhält einen energiereicheren Zustand - und daß nach einiger Zeit ein Photon wieder abgegeben wird. Dessen Eigenschaften können bestimmt werden. Jedes zur Fluoreszenz befähigte Molekül - in der Regel kleinere Aromaten - besitzt eine Vorzugsrichtung der Energieaufnahme und eine Vorzugsrichtung der Energieabgabe. Der Raumwinkel zwischen beiden Richtungen bestimmt die sogenannte Grenzpolarisation p_0 . Wird eine Lösung mit linear polarisiertem Licht bestrahlt, so werden diejenigen Moleküle zur Fluoreszenz angeregt, deren Vorzugsrichtung der Energieaufnahme gerade der Polarisationsrichtung des Lichts entspricht. Wenn das angeregte Molekül nach einigen Nanosekunden das Photon in der Emissionsvorzugsrichtung wieder abgibt, hat es sich thermisch

schon mehr oder weniger bewegt; wie stark, das hängt von der Größe des Moleküls (effektives Molekülvolumen V) ab, von der Viskosität der Lösung (η), von der Temperatur (absolute Temperatur T) und nicht zuletzt auch von der Zeit, die das Molekül hatte, um sich zu bewegen, ehe das Lichtquant emittiert wurde (Fluoreszenzüberlebenszeit τ).

Es werden die Anteile des Fluoreszenzlichts gesondert gemessen, deren Schwingungsrichtungen parallel ($I_{\parallel}$) und senkrecht ($I_{\perp}$) zur Schwingungsrichtung des Anregungslichtes liegen. Als Polarisationsgrad wird der Quotient und die Summe beider Anteile bezeichnet. Als Anisotropie definiert man den Quotienten aus der Differenz beider Anteile und der Gesamtfluoreszenz:

$$p = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}; \quad r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}; \quad r = \frac{2p}{3 - p}; \quad 3.1./1$$

Die Abhängigkeiten lassen sich für sphärische Moleküle als Funktion des Polarisationsgrades zusammenfassen (52):

$$\frac{1}{p} = \frac{1}{p_0} + \left(\frac{1}{p} - \frac{1}{3} \right) \frac{k T}{V \eta} = \frac{1}{p} + \left(\frac{1}{p_0} - \frac{1}{3} \right) 6 D \tau \quad 3.1./2$$

In Abbildung 9 ist die Empfindlichkeit des Polarisationsgrades gegenüber relativen Volumenänderungen des betrachteten Moleküls in Abhängigkeit von dem Produkt aus Rotationsdiffusionskonstante D und Fluoreszenzüberlebenszeit dargestellt. Es wird deutlich, daß sich der Polarisationsgrad bei Vergrößerungen, oder überhaupt Veränderungen der Gestalt des fluoreszierenden Moleküls dann am stärksten ändert, wenn der reziproke Wert der Rotationsdiffusionskonstante in der gleichen Größenordnung liegt wie die Fluoreszenzüberlebenszeit.

Reziproke der Rotationsdiffusionskonstanten für $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ liegen bei 15 und 22 nsec (41a). Entsprechend kann man das Bindungsverhalten von Synthetasen mit Ethidium-markierten tRNAs genauer beobachten als mit Proflavin-markierten tRNAs, da die Fluoreszenzüberlebensdauer von Ethidumbromid (im folgenden abgekürzt: EB) 21 nsec beträgt, die von Proflavin (im folgenden abgekürzt: PF) 5 nsec. Die Polarisation der Tryptophanfluoreszenz von SRS änderte sich durch tRNA-

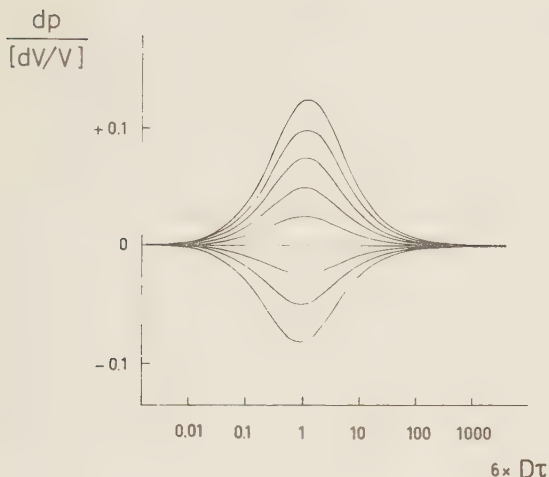


Abb. 9 Abhängigkeit der Empfindlichkeit des Polarisationsgrades
für relative Volumenänderungen des Fluorophor-markierten
Moleküls von Rotationsdiffusionskonstante und Fluoreszenz-
überlebenszeit für verschiedene Werte der Grenzpolarisati-

Von oben nach unten entsprechen die Linien Werten der Grenzpolarisati-
tion von 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0, - 0.1, - 0.2 und - 0.333.

Zusatz nicht meßbar, weil die Überlebensdauer der Tryptophanfluoreszenz nur etwa 1 nsec beträgt, und weil sich das Molekylvolumen durch die tRNAs nur um etwa ein Drittel vergrößert.

3.2. Experimente mit assoziativ an tRNA gebundenem Proflavin und Ethidiumbromid

Zwischen Nukleinsäuren und Acridinderivaten (in der kationischen Form) gibt es zwei Typen der Komplexbildung. Bei niedriger Ionenstärke und im Farbstoffüberschuß wird ein kooperatives Bindungsgleichgewicht beobachtet, das durch Hypochromie und Blauverschiebung des Absorptionspektrums des Farbstoffs charakterisiert ist.

Elektrostatische Bindung an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäure und die Tendenz der Aromaten zu assoziieren können als Mechanismus dieser sogenannten Außenbindung angesehen werden. Bei niedriger Acridin- und hoher Nukleotidkonzentration zeigt Rotverschiebung der Farbstoffabsorption an, daß ein zweiter Bindungstyp überwiegt. Man stellt sich vor, daß die Farbstoffmoleküle aufgrund von van der Waals'schen Wechselwirkungen zwischen den koplanar geordneten Basen der Nukleinsäure festgehalten werden. Diese Art zu binden wird Interkalierung genannt, verschiedene Modelle hierfür sind in (73) und (74) beschrieben worden. Die Raumstruktur der Nukleinsäure wird durch ein interkaliertes Farbstoffmolekül so verändert (75), daß Interkalierung in benachbarte Basenzwischenräume weniger wahrscheinlich wird. Damit läßt sich erklären, daß typischerweise ein Bindungsplatz für den Farbstoff pro zwei bis drei Basenpaare gefunden wird.

Für die kooperative Bindung ist von Schwarz (76) eine mathematische Formulierung ausgearbeitet worden. Eine entsprechende quantitative Analyse der Bindung von PF an poly(A), poly(U) und tRNA ist von Dourlent und Hélène (77) durchgeführt worden.

In dieser Arbeit sollte die Bindung von PF oder EB an die tRNA benutzt werden, um Aussagen über das Bindungsgleichgewicht von tRNA und Synthetase zu gewinnen. Dazu war es notwendig, sich mit Hilfe von Kontrollversuchen darüber zu orientieren, welches Fluorophor für Messung und Auswertung besser geeignet war, und ob nicht das ausgewählte Fluorophor die Beladungsreaktion hemmte.

3.2.1. Bindungsgleichgewichte von tRNA^{Ser} und tRNA^{Phe} mit PF und EB

Zunächst wurden PF und EB im Phosphatpuffer mit tRNA^{Ser} und tRNA^{Phe} titriert. Für die Titrationsen wurden die Konzentrationen so gewählt, daß in allen Meßpunkten die Nukleotidkonzentration größer als die Farbstoffkonzentration war. Es sollte also überwiegend Interkalierung vorliegen. Assoziation zwischen Farbstoffmolekülen konnte vernachlässigt werden, da die Farbstoffkonzentrationen nie höher als 20 µM

lagen (76 b).

Die PF-Fluoreszenz wurde am isosbestischen Punkt für freies und interkaliertes PF mit Licht der Wellenlänge 455 nm angeregt. Bei Titrationen mit tRNA^{Ser} nahm der Polarisationsgrad von unter 0.1 auf über 0.35, mit tRNA^{Phe} dagegen nur geringfügig zu (siehe Tabelle 1). Die Quantenausbeute sank durch tRNA^{Ser} auf etwa 20 %, des Ausgangswertes, tRNA^{Phe} verringerte die Quantenausbeute von PF wesentlich weniger. Der Verlauf der PF-Fluoreszenzintensität wurde nach einem Wechselwirkungsmodell ausgewertet, in welchem eine Klasse gleicher und voneinander unabhängiger Bindungsplätze angenommen wurde. Die Computeranpassungen ergaben drei bis vier Bindungsplätze für PF an tRNA^{Ser} mit einer Bindungskonstante bei 10^6 M^{-1} .

Die Fluoreszenz von PF wird fast völlig gelöscht, wenn PF an poly-d (G-C), jedoch verstärkt, wenn es an poly-d(A-T) gebunden wird (78). Die PF-Fluoreszenz dürfte also deshalb so stark von tRNA^{Ser} verringert worden sein, weil G- und C-reiche Abschnitte für PF gut zugänglich sind. Reich an G-C-Paaren und an gestapelten G und C sind in tRNA^{Ser} besonders die S-Region und Schleifenbereiche.

Die isosbestische Region für freies und interkaliertes EB liegt bei Wellenlänge 507 nm. Durch Interkalierung wird das Absorptionsmaximum des EB von 480 auf 520 nm verschoben (79), und die Quantenausbeute um mehr als den Faktor 10 vergrößert. EB wurde bei Titrationen mit Licht der Wellenlänge 546 nm zur Fluoreszenz angeregt; bei dieser Wellenlänge absorbiert gebundenes EB aufgrund der Rotverschiebung des Absorptionsspektrums mehr Licht als das freie EB. Die Vergrößerung der Quantenausbeute und die Anregung der Fluoreszenz bei 546 nm zusammen bewirkten, daß ein gebundenes EB-Molekül 40- bis 50mal mehr zur gemessenen Fluoreszenzintensität beitrug als ein freies. Die Meßsicherheit erhöhte sich damit entsprechend.

In Titrationen von EB mit tRNA^{Ser} wurde neben einer etwa 40fachen Erhöhung der Fluoreszenzintensität auch eine Erhöhung des Polarisationsgrades von 0.06 auf 0.29 beobachtet (siehe auch Abb. 10). Der

Polarisationsgrad stieg bei den ersten Zugaben von tRNA^{Ser} stark bis zu einem Konzentrationsverhältnis von 10 bis 15 EB pro tRNA an, bei weiterer Erhöhung der tRNA-Konzentration weniger stark bis zu einem Konzentrationsverhältnis von 1.5 bis 2 EB pro tRNA. Auch die Steigerung der Fluoreszenzintensität durch Erhöhung der tRNA-Konzentration ließ darauf schließen, daß zwei Arten von Bindungsstellen mit verschieden vielen Bindungsplätzen vorlag.

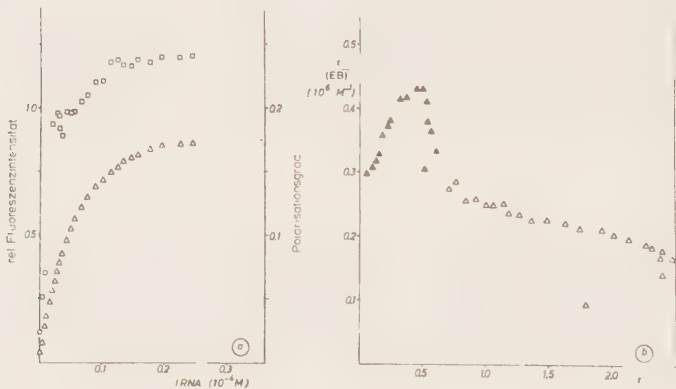


Abb. 10 (a): Fluoreszenz von EB ($2 \times 10^{-5} \text{ M}$) in Abhängigkeit von der Konzentration zugesetzter tRNA^{Ser} im Phosphatpuffer bei 26° C

(Δ) relative Fluoreszenzintensität; ($\square$) Polarisationsgrad

(b): Scatchard-Auftragung der Intensitätsmeßwerte von (a) (Δ) und einer analogen Titration bei $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ EB ($\blacktriangle$)

r bedeutet die Anzahl Mole gebundenen EBs pro Mol tRNA, (EB) ist die Konzentration freien EBs.

Die Titrationsmeßpunkte wurden nach Scatchard (80) und nach Charlier und Grosjean (81) aufgetragen. Die graphische Auswertung ergab nach beiden Methoden 1 Bindungsplatz für EB an tRNA^{Ser} mit einer Bindungskonstante von etwa 10^6 M^{-1} und fünf bis zehn Bindungsplätze mit

geringerer Affinität. Aus der Auftragung nach Scatchard (Abb. 10) war abzulesen (vgl. (82)), daß das Bindungsgleichgewicht von tRNA^{Ser} und EB auch zum Teil durch einen kooperativen Bindungsmechanismus bestimmt wurde.

Die Bindungsstärke nahm mit steigender Temperatur ab. Ein negativer Wert der Bindungsenthalpie ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus anderen Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen EB und Nukleinsäuren (z. B. 79).

EB wurde auch mit tRNA^{Ser} -Fragmenten titriert, die die Nukleotide 1-36, 37-85 und 45-85 enthielten. Ser 45-85 enthält die Nukleotide von C-C-A-Ende her bis einschließlich der S-Region. Die Spaltungsstelle 36/37 liegt am Anticodon. Die Auswertung der doppelt reziproken Auftragung (Abb. 11) ergab für Ser 1-36 und Ser 45-85 drei, für

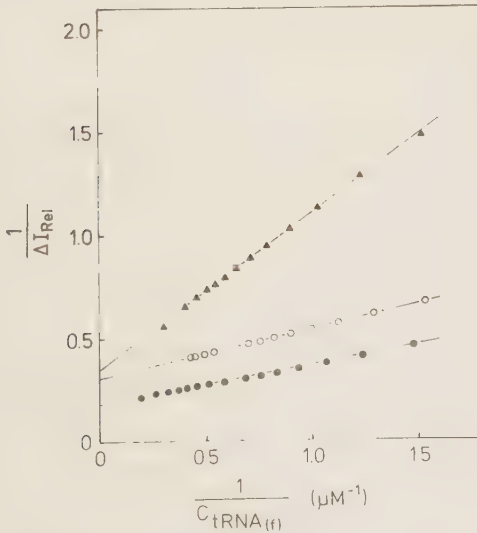


Abb. 11 EB (2×10^{-6} M) wurde mit tRNA^{Ser} -Fragmenten in Phosphatpuffer bei 14°C titriert. ($\blacktriangle$) Ser 1-36, ($\circ$) Ser 45-85, ($\bullet$) Ser 37-85; $1 / \Delta I_{\text{Rel}}$ bedeutet Sättigungsgrad des EB, $C_{\text{tRNA(f)}}$ Konzentration an freiem Fragment.

Ser 37-85 vier Bindungsplätze, deren Affinität zu EB sich durch Bindungskonstanten von $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ für Ser 1-36 und durch $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ für die beiden anderen Fragmente beschreiben ließ.

Auftragen nach Scatchard ließ auch für die tRNA-Teilstücke kooperatives Bindungsverhalten erkennen. Verlust der Nukleotide 37 bis 44 verursachte offenbar den Verlust eines Bindungsplatzes für EB. Die Anzahl Bindungsstellen für EB an Ser 1-36 und Ser 37-85 zusammengekommen ergab ungefähr die Anzahl EB-Bindungsstellen an tRNA^{Ser}. An der intakten tRNA fand sich zusätzlich der Bindungsplatz mit höherer Affinität.

Die Fluoreszenzintensität von EB erhöhte sich bei Titrationen mit tRNA^{Phe} auf das Fünzigfache des Ausgangswertes. Analoge Auswertung wie für tRNA^{Ser} ergab eine Bindungsstelle für EB und eine Bindungskonstante bei 10^6 M^{-1} bei Titrationen in Phosphatpuffer und bei 24°C, und weitere Bindungsstellen mit geringerer Affinität zu EB. Urbanke et al. (83) und Tao et al. (84) fanden ebenfalls an Mg-stabiler tRNA^{Phe} einen Bindungsplatz für EB.

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse konnte entschieden werden, welches Fluorophor zur Untersuchung der Bindung von tRNA^{Ser} und tRNA^{Phe} an die Synthetasen besser geeignet war: Durch tRNA^{Phe} wurde die Fluoreszenzintensität von PF wenig geändert. Die Meßsicherheit bei den Titrationen von EB mit tRNA^{Ser} und tRNA^{Phe} war wesentlich größer als bei PF-Titrationen. An welchen tRNA-Abschnitten EB gebunden wird, ist kaum zu bestimmen. EB besitzt zu verschiedenen Sequenzabschnitten verschiedene Affinität (85); wie die Tertiärstruktur der tRNA die EB-Bindung an verschiedene Stellen verändert, ist noch nicht quantitativ untersucht. Die EB-Fluoreszenz wird nicht basenspezifisch verstärkt. Dies zeigten Titrationsexperimente mit DNA definierter Basensequenz analog zu denen in (78). Hingegen wird die Fluoreszenz von EB stark erhöht bei Bindung an Nukleinsäuren mit doppelhelikalen Bereichen oder einzelsträngigen Bereichen mit gestapelten Basen. Für tRNA in Gegenwart von MgCl_2 kann angenommen werden, daß neben den doppelsträngigen auch die Einzelstrangbereiche Basenstapelung aufweisen (86). Die beiden Befunde, die vor

allem im Hinblick auf die Kinetik bedeutend schienen, führten neben den eben aufgezählten Gründen dazu, EB vorzuziehen: Die Fluoreszenzüberlebenszeit von gebundenem EB ist mit 21 nsec wesentlich länger als die von PF (bei 5 nsec). Außerdem tragen freie EB-Moleküle nur sehr wenig zur Fluoreszenz bei (Tab. 1).

Tabelle 1

Fluoreszenzeigenschaften freier und assoziativ gebundener Fluorophore bei 15° C

	Relative Fluoreszenz- intensität a)	Relative Quanten- ausbeute b)	Fluoreszenz- überlebens- zeiten (nsec)	Polarisations- grad c)
PF	---	1.0	---	0.014
tRNA ^{Ser} /PF		0.18	---	0.316(0.120)
tRNA ^{Phe} /PF		0.94 ^{d)}	---	0.047 ^{d)}
tRNA ^{Ser} /PF		0.29	---	0.141
EB	1.0	1.0	1.6	0.064
tRNA ^{Ser} /EB	37.1	10.3	21.3	0.287(0.258)
tRNA ^{Phe} /EB	47.2	10.0 ^{d)}	---	0.275 ^{d)}
tRNA ^{Ser} /EB/SRS	28.5	6.2	20.6	0.280

a) angeregt bei 546 nm; letzte Meßpunkte aus Titrationen

b) angeregt bei 507 nm für EB und bei 455 nm für PF (isosbestische Regionen)

c) in Klammern gesetzte Werte wurden bei gleichen tRNA-Fluorophor-Konzentrationen gemessen wie im Komplex mit SRS

d) bei 19° C gemessen

In einem Titrationsexperiment wurde kontrolliert, wie stark EB an SRS gebunden wird. Bei einer SRS-Konzentration von 1×10^{-5} M (siehe Abb. 3 d in (41a)) betrug die Fluoreszenzintensität erst das 1.5fache der Fluoreszenzintensität des freien EB. Der Polarisationsgrad stieg von 0.06 auf 0.16. Sowohl Fluoreszenzintensität als auch Polarisations-

grad zeigten mit wachsender SRS-Konzentration einen zunächst geringeren, dann einen stärkeren Anstieg, wie es für sigmoide Sättigungskurven typisch ist. Bei etwa 10^{-5} M SRS war Halbsättigung erreicht, was bedeutet, daß eine durch Anpassung erhaltene Bindungskonstante in der Größenordnung 10^5 M^{-1} läge. Möglicherweise bindet EB an negativ geladene Gruppen der Synthetase in ähnlicher Weise wie an die Phosphatgruppen von Nukleinsäuren.

3.2.2. Aminoacylierungsgeschwindigkeit in Gegenwart von EB

Es ist bekannt, daß EB die Aktivität von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen hemmen kann (87). Wenn die EB-Bindung an tRNA und die tRNA-Be-
ladung miteinander vereinbar sind, können Titrationen von EB-gesättigter tRNA mit Synthetase zu sinnvollen Ergebnissen führen.

Im Standard-Enzymtest wurde die Aktivität von PRS und SRS in Gegenwart verschiedener EB-Konzentrationen gemessen. EB hemmte in Konzentrationen bis 5.5×10^{-6} M die PRS-Aktivität im wesentlichen nichtkompetitiv (siehe Abb. 12), die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurde verringert, das K_m für tRNA^{Phe} änderte sich nicht signifikant. Die ermittelten Werte von K_m für tRNA^{Phe} (0.6×10^{-6} M) und Umsatzzahl (200 Min^{-1}) lagen etwas höher als allerdings mit weniger reinen PRS-Präparaten (89) oder unter anderen Bedingungen (60) gewonnene Werte für K_m (0.1 bis 0.25×10^{-6} M) und Umsatzzahl (63 bis 136 Min^{-1}). Auswertung nach Dixon (88) ergab als K_I von EB 1.5×10^{-5} M. Da EB bei Titrationen in Konzentrationen von 1 bis $3 \text{ }\mu\text{M}$ vorlag, war dementsprechend anzunehmen, daß sich die Bindung von PRS an tRNA^{Phe} in Gegenwart und in Abwesenheit von EB meßbar unterschieden. Deshalb wurde darauf verzichtet, tRNA^{Phe} und assoziativ gebundenes EB mit PRS zu titrieren.

Verglichen mit der Hemmwirkung auf PRS und tRNA^{Phe} war die Hemmung der tRNA^{Ser}-Aminoacylierung durch EB gering. Bis zu einer EB-Konzentration von 1.6×10^{-5} M war bei der gegebenen Meßgenauigkeit keine Hemmung nachweisbar (siehe Abb. 12). Offenbar besitzen die EB-Bindungsstellen, die kompetitiv die Aminoacylierung von

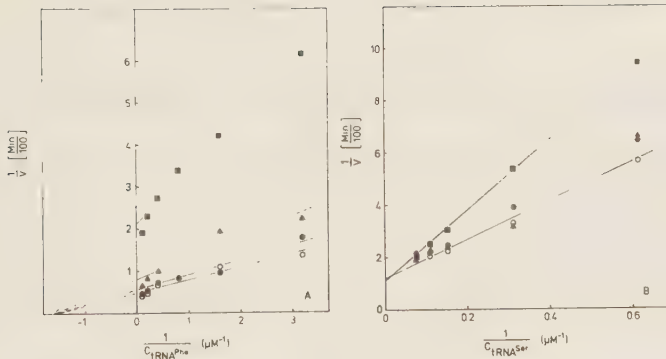


Abb. 12 Geschwindigkeit der Aminoacylierung von tRNA^{Phe} (A) und tRNA^{Ser} (B) in Gegenwart verschiedener EB-Konzentrationen. Auftragung nach Lineweaver und Burk.

Standardenzymtest, 25°C , (A) reine tRNA^{Phe} , (B) reine tRNA^{Ser}
 (A): EB-Konzentrationen: ($\bigcirc$) 0, ($\bullet$) $2.2 \times 10^{-6} \text{M}$, ($\blacktriangle$) $1.1 \times 10^{-5} \text{M}$, ($\blacksquare$) $5.5 \times 10^{-5} \text{M}$.
 (B): EB-Konzentrationen: ($\bigcirc$) 0, ($\bullet$) $8.0 \times 10^{-6} \text{M}$, ($\blacktriangle$) $1.6 \times 10^{-5} \text{M}$, ($\blacksquare$) $4.0 \times 10^{-5} \text{M}$.

tRNA^{Ser} hemmen, für EB eine relativ geringe Affinität. Die EB-Inhibitionskonstante war dreimal größer als für die tRNA^{Phe} -Beladung. K_m ($0.2 \times 10^{-6} \text{M}$) und Umsatzzahl (65 Min^{-1}), wie sie aus Abbildung 12 hervorgehen, stimmten mit anderen Angaben (60) überein (K_m 0.1 bis $0.38 \times 10^{-6} \text{M}$), Umsatzzahl 12 bis 50 Min^{-1}). Der oben genannte K_i -wert von $4.5 \times 10^{-5} \text{M}$ bedeutet, daß bei einer Konzentration an freiem EB von $4.5 \times 10^{-5} \text{M}$ die Hemmwirkung auf die tRNA^{Ser} -Beladungsgeschwindigkeit 50 % der maximalen Hemmwirkung beträgt. Da in Titrationsen EB 15- bis 45mal geringer konzentriert eingesetzt wurde, sollte unter Titrationsbedingungen die Hemmwirkung bis zu etwa

5 % betragen können. EB-Moleküle, die die Wechselwirkungen zwischen SRS und tRNA^{Ser} behinderten, konnten also zur Fluoreszenzintensität und -polarisation nur im Bereich der Meßunsicherheit beitragen.

3.2.3. Titration assoziativ mit EB-markierter tRNA mit SRS

Für die Titrations mit SRS wurden die Konzentrationen von EB und tRNA so gewählt, daß ein Molekül EB pro tRNA-Molekül vorlag und daß mehr als 80 % des EB an tRNA gebunden waren; aus den Sättigungskurven und Bindungskonstanten für EB und tRNA ließ sich ableiten, daß diese Bedingungen erfüllt waren, wenn EB und tRNA je in einer Konzentration von 1 bis 2 μM vorlagen.

In Titrations von EB und tRNA^{Ser} mit SRS wurde die Fluoreszenzintensität durch SRS um 10 bis 20 % verringert, der Polarisationsgrad stieg deutlich sigmoid um etwa 5 % an. Sowohl die Sigmoidität als auch die Verringerung der Fluoreszenzintensität waren bei Temperaturen um 10⁰ C stärker ausgeprägt als bei Raumtemperatur (Abb. 13a).

Um Sättigung von tRNA^{Phe} zu erreichen war etwa doppelt soviel SRS notwendig wie für Sättigung gleicher tRNA^{Ser}-Mengen. Diese Sättigungskurve war nicht ausgeprägt sigmoid. Titration der tRNA^{Phe} mit SRS erhöhte den Polarisationsgrad der EB-Fluoreszenz um 7 %, die Fluoreszenzintensität um 20 % (Abb. 13b).

Eine vollständige mathematische Beschreibung des ternären Bindungsgleichgewichts ist kompliziert, weil kooperative Bindungsmechanismen vorliegen, und war schon deshalb nicht sinnvoll, weil die Meßunsicherheit und die beschränkte Anzahl Meßpunkte eine sichere Anpassung von etwa 10 Bindungsparametern nicht erlaubten. Änderungen der Lage des Bindungsgleichgewichts zwischen EB und SRS dürften nicht meßbar zur Sigmoidität der Sättigungskurve beigetragen haben, sonst würde auch die Sättigungskurve für tRNA^{Phe} sigmoid verlaufen sein.

Es war zu fragen, weshalb durch Sättigung der tRNA^{Ser} mit SRS die Fluoreszenzintensität um 20 % verringert wurde, da EB, tRNA^{Ser} und SRS homogen waren. Die Fluoreszenzüberlebenszeiten des tRNA^{Ser}

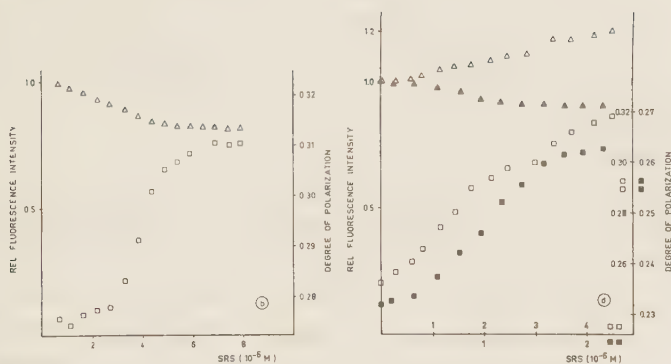


Abb. 13 Linkes Bild: Titration des Komplexes aus EB und tRNA^{Ser}
(je 1×10^{-6} M) mit SRS in Phosphatpuffer bei 5° C.
Rechtes Bild: Titration des Komplexes aus EB und tRNA^{Ser}
(ausgefüllte Symbole; je 1×10^{-6} M) und aus EB und tRNA^{Phe}
(leere Symbole; je 2.1×10^{-6} M) mit SRS bei 21° C

(Δ , $\blacktriangle$) relative Fluoreszenzintensität, ($\square$, $\blacksquare$) Polarisationsgrad

gebundenen EB im Komplex mit und frei von SRS^{**} unterschieden sich nur um etwa 3 % (siehe Tab. 1). SRS besetzte also wahrscheinlich an tRNA^{Ser} einen Teil der 6 bis 10 EB-Bindungsplätze. Da hierdurch die Konzentration zugänglicher EB-Bindungsplätze abnahm, sank auch der Anteil des gebundenen am gesamten EB in der Lösung. Daß sich die Fluoreszenzüberlebenszeit gering änderte, kann auf eine neue Verteilung des EB auf die restlichen Bindungsplätze an tRNA^{Ser} zurückzuführen sein. Es ist nicht auszuschließen, daß diese Umvertei-

^{**} Die Messungen wurden von Herrn R. Rigler im Labor von Prof. J.D.W. van Voorst unter Mithilfe von D. Beelaar und J. Hogen-dijk in Amsterdam durchgeführt (41a, 90b).

lung meßbar zum Verlauf der sigmoiden Bindungskurve beitrug. Jedenfalls war die S-Form stärker ausgeprägt als in den Titrationsen, in denen bei konstanter SRS-Konzentration die Tryptophanfluoreszenz gemessen und tRNA^{Ser} zugesetzt wurde. Welcher Bindungsmechanismus die sigmoiden Sättigungskurven verursachte, wurde weiter untersucht (siehe Abschnitt 4.).

3.3. Messungen mit Hilfe von kovalent an die tRNA gebundener Fluorophore

1971 gelang es Wintermeyer und Zachau (53), Fluorophore mit hoher Quantenausbeute kovalent und spezifisch an tRNA^{Ser} und an tRNA^{Phe} zu koppeln. Damit waren erstmalig künstliche Fluorophore in tRNAs eingeführt, die nicht entscheidend weniger mit Aminosäure beladbar waren als nicht modifizierte tRNAs. Ethidium war in tRNA^{Phe} an der Stelle der Base Y^+ , an tRNA^{Ser} in der hU-Schleife gebunden, mit NaBH_4 reduziert, und reoxidiert. Die Fluoreszenzeigenschaften der modifizierten tRNAs änderten sich durch Bestrahlung von der Intensität und Dauer, wie sie bei Titrationsen gewöhnlich eingesetzt wurde, nicht meßbar.

Für die Untersuchung der Wechselwirkungen mit Synthetasen hatten diese tRNAs (im folgenden als $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ bezeichnet) einige Vorteile gegenüber tRNAs mit nur assoziativ gebundenem EB: Hemmung der Aminoacylierung mußte bei der Wahl der Farbstoff-, tRNA- und Synthetasekonzentration nicht berücksichtigt werden. EB verteilte sich nicht auf eine größere Anzahl kompetitierender Bindungsplätze, insbesondere nicht auf Bindungsplätze an der Synthetase, sondern war unter allen Bedingungen zu 100 % an die tRNA gebunden. Dadurch wurde eine quantitative Auswertung von Titrationsen, auch unter verschiedenen Pufferbedingungen, möglich.

3.3.1. Vergleich nicht modifizierter mit modifizierten tRNAs

$\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ und tRNA^{Phe} bzw. $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ und tRNA^{Ser} werden mit

gering unterschiedlichen Geschwindigkeiten von PRS bzw. SRS aminoacyliert (53). Unterschieden sich die modifizierten tRNAs in den Bindungseigenschaften wesentlich von den nicht modifizierten?

Abbildung 14 zeigt PRS-Titrationskurven mit tRNA^{Phe} und $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$. Bei Zusatz von $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ wurde die PRS-Fluoreszenz stärker gelöscht als bei tRNA^{Phe} -Zugabe. Dies kann auf Energieübertragung zurückzuführen sein, da das Emissionsspektrum des Tryptophans und das Anregungsspektrum von EB im Wellenlängenbereich von 300 bis etwa 350 nm überlappen. Energieübertragung tritt nur dann in meßbarem Umfang auf, wenn die beteiligten Fluorophore in enge Nachbarschaft zueinander kommen. Deshalb konnte Tryptophanfluoreszenz nur von EB reabsorbiert werden, wenn das zugehörige tRNA-Molekül an PRS gebunden war.

Aus einer Auftragung nach Scatchard ließ sich für das Bindungsgleichgewicht PRS- tRNA^{Phe} bzw. PRS- $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ als Anzahl Bindungsstellen 1.2 bzw. ein Wert zwischen 1.0 und 1.3 ablesen, Computeranpassungen ergaben für die Assoziationskonstanten Werte von 5.5 bzw. $8.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, mit Standardabweichungen von ± 1.3 bzw. $\pm 2.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Die Titrationskurven von PRS mit tRNA^{Phe} und $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ zeigten also keinen signifikanten Unterschied zwischen der modifizierten und der nicht modifizierten tRNA im Bindungsverhalten.

tRNA^{Phe} und $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ wurden auch in Titrationsexperimenten verglichen, in denen die Fluoreszenzanisotropie von $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ für die Berechnung des Bindungsgrades benutzt wurde (Abb. 15). Zuerst wurde $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ mit PRS gesättigt und dann mit nicht modifizierter tRNA^{Phe} von PRS wieder verdrängt. Für die Auswertung wurde vorausgesetzt, daß tRNA^{Phe} und $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ um dieselben Bindungsplätze konkurrieren. Aus der Auftragung nach Scatchard wurde für diese Titration (Abb. 15c) ein n-Wert von 1.3 und eine Assoziationskonstante von $4.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ angenommen. Aufgrund des Massenwirkungsgesetzes für die beiden Gleichgewichte und der Beziehung zwischen Sättigungsgrad und Anisotropie (siehe Abschn. 2.2.) kann man eine einfache Gleichung aufstellen, die als einzige Unbekannte die Stabilitätskonstante des Bindungsgleichgewichts zwischen tRNA^{Phe} und

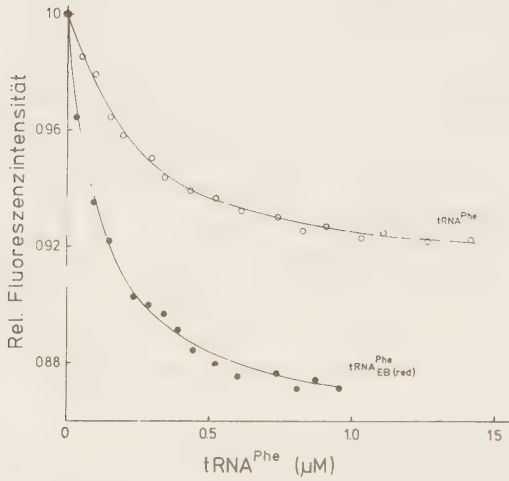


Abb. 14 Titration von PRS ($0.2 \times 10^{-6} \text{ M}$) mit tRNA^{Phe} (○) und mit $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ (●) bei 25° C in Phosphatpuffer

Die durchgezogenen Linien entsprechen Computeranpassungen.

PRS enthält. Diese Konstante wurde für jeden der zweiten Titration (Abb. 15B) berechnet. In Abbildung 15D ist die Abhängigkeit der K-Werte von der tRNA^{Phe} -Konzentration dargestellt. Lineare Extrapolation auf sehr kleine tRNA^{Phe} -Konzentrationen ergab einen K-Wert von $3.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Dieser Wert ist als gleich mit dem für das Gleichgewicht $\text{PRS-tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ zu betrachten.

Ein analoger Vergleich von tRNA^{Ser} mit $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ ergab die eben genannten ähnlichen Resultate.

Daß die apparente Bindungskonstante über den untersuchten Konzentrationsbereich von tRNA^{Phe} nicht konstant war, ließ auf zusätzliche, schwächere und die tRNA nicht so stark immobilisierende Bindungsstellen an PRS schließen, die bei den niedrigen $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ Konzentrationen in der Scatchard-Auftragung nicht erkennbar wurden. Darauf deutet auch der Befund von mehr als 1.0 Bindungsstellen für

tRNA^{Phe} an PRS hin. In einer im Druck befindlichen Arbeit zeigen Fasiolo et al. (16) und Hörz und Zachau (90a), daß PRS wahrscheinlich zwei Bindungsplätze für tRNA^{Phe} besitzt.

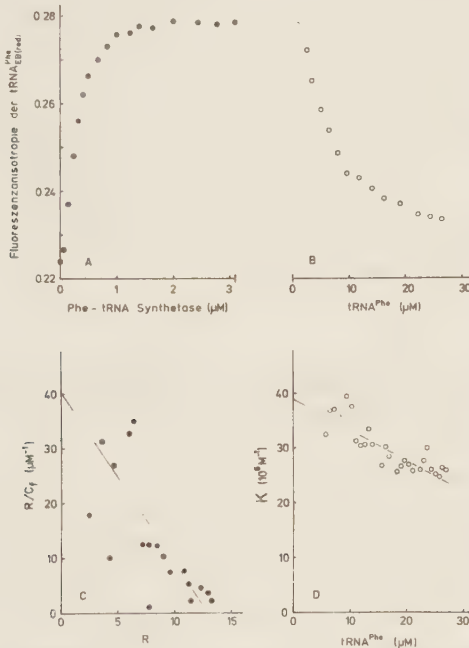


Abb. 15 Kompetition von tRNA^{Phe} mit tRNA^{Phe}_{EB} um Bindung an PRS

Phosphatpuffer, 25° C

(A): Fluoreszenztitration von tRNA^{Phe}_{EB} (0.77 x 10⁻⁶ M) mit PRS.

(C): Auswertung von (A). Auftragung nach Scatchard. R bedeutet Anzahl gebundener Mole tRNA^{Phe}_{EB} pro Mol PRS, C_f Konzentration freier tRNA^{Phe}_{EB}.

(B): Fluoreszenztitration des Komplexes aus tRNA^{Phe}_{EB} (0.77 x 10⁻⁶ M) und PRS (3 x 10⁻⁶ M) mit tRNA^{Phe}.

(D): Auswertung von (B). Für jeden Meßpunkt ergibt sich ein Wert der Assoziationskonstante K für das Gleichgewicht zwischen PRS und tRNA^{Phe}. (In (A) wurde jeder zweite bis dritte Meßpunkt eingezeichnet. In (D) wurden die ersten, stark streuenden Punkte nicht mit eingezeichnet.)

Die modifizierten tRNAs unterschieden sich in den Bindungseigenschaften von den nicht modifizierten nicht signifikant, jedenfalls weniger als in der Geschwindigkeit der Aminosäurebeladung. Ergebnisse aus Titrationsen mit tRNA_{EB} sind also Ergebnissen aus entsprechenden Experimenten mit tRNA gleichwertig. Aus Untersuchungen der tRNA-Aminoacylierung durch PRS aus E.coli (30, 31) ging hervor, daß verschiedene tRNAs sich in der Beladungsgeschwindigkeit wesentlich stärker unterschieden als in der Michaeliskonstante. Wenn Ergebnisse aus Experimenten der beiden oben beschriebenen Arten nicht völlig übereinstimmen, so waren unterschiedliche Synthetasepräparate verwendet worden.

3.3.2. Abhängigkeit der Fluoreszenzpolarisation von tRNA_{EB} von der KCl- und MgCl₂-Konzentration im Puffer

Zweiwertige Kationen beeinflussen die Aminoacylierungsreaktion durch zwei Mechanismen: Mg⁺⁺ scheint eine definierbare, für die Aminoacylierung günstige Tertiärstruktur der tRNA zu stabilisieren (91, 92). Daneben wird bei einigen Synthetasen die Aminosäure in Abwesenheit von Mg⁺⁺ nicht aktiviert (93 - 97); möglicherweise muß das Pyrophosphat mit Mg⁺⁺ einen Komplex bilden, damit die Pyrophosphorolyse ablaufen kann (98). In Abwesenheit von MgCl₂ läuft bei SRS die Gesamtreaktion nicht ab (55). Der Mg⁺⁺-Bedarf von PRS aus Bäckerhefe ist abhängig von Art, Konzentration und pH-Wert des Puffers (99). Einwertige Kationen beeinflussen die Aminoacylierungsreaktion in ähnlicher Weise, jedoch nicht so effektiv wie zweiwertige Kationen.

3.3.2.1. Salzabhängigkeit der Beweglichkeit freier tRNA-EB

Bei Titrationsen von tRNA_{EB}^{Ser} und tRNA_{EB}^{Phe} mit KCl und MgCl₂ stieg jeweils der Polarisationsgrad an (siehe Abb. 16). Dies bedeutet, daß die Raumstruktur zumindest großer Teile der tRNA, einschließlich der Regionen, die die Farbstoffe enthalten, in sich stabiler und rigider wurde. Entsprechend dem höheren Molekulargewicht von tRNA^{Ser} im Vergleich zu tRNA^{Phe} liegt bei gleichem Fluorophor

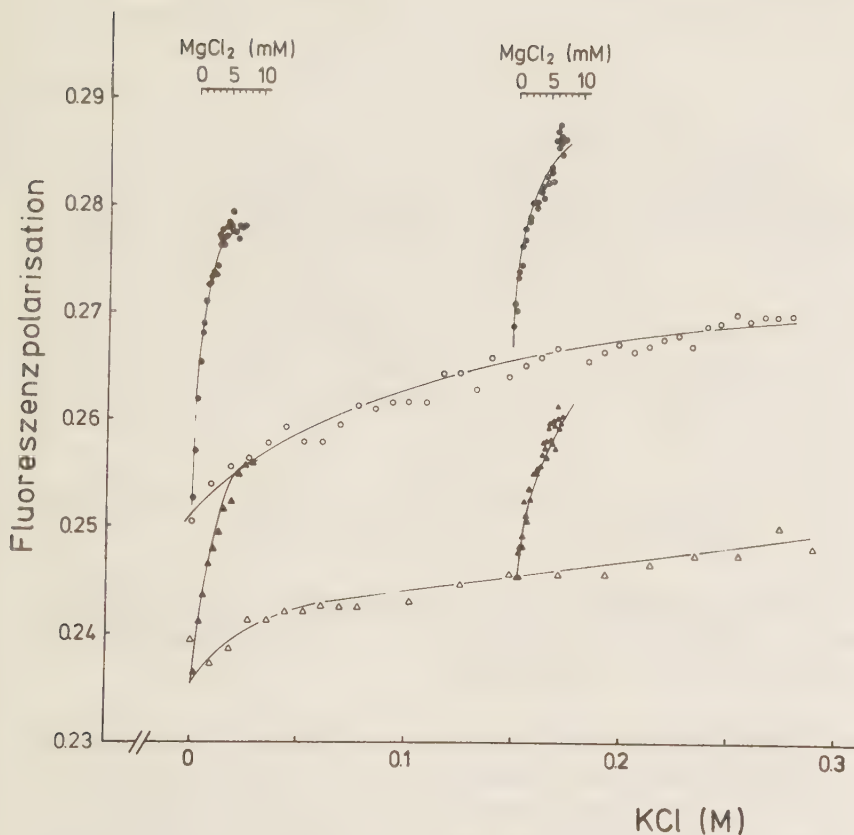


Abb. 16 Abhängigkeit der Fluoreszenzpolarisation von tRNA^{Ser}_{EB} (○, ●) und tRNA^{Phe}_{EB} (△, ▲) von der KCl- (leere Symbole) und MgCl₂-Konzentration (ausgefüllte Symbole)

Phosphatpuffer, jedoch ohne MgCl₂ bei 25°C. Die Titrations mit MgCl₂ wurden in Abwesenheit und in Gegenwart von 0.15 M KCl ausgeführt.

und wohl vergleichbarer Raumstruktur der Polarisationsgrad von tRNA^{Ser}_{EB} höher als der von tRNA^{Phe}_{EB}. Bei niedriger Ionen-

stärke war die Änderung des Polarisationsgrades auf Zusatz von MgCl_2 größer als in Gegenwart von 0.15 M KCl. Dies stimmt überein mit Befunden (100), daß zur Stabilisierung einer tRNA-Struktur in Gegenwart einwertiger Ionen weniger zweiwertige Ionen benötigt werden als in deren Abwesenheit.

Eine Erhöhung der Fluoreszenzpolarisation kann nur dann als Verringerung der Beweglichkeit des Fluorophors gedeutet werden, wenn ausgeschlossen ist, daß sich die Fluoreszenzüberlebenszeit verringert hat. Durch MgCl_2 -Zusatz wurde bei $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ und bei $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ die Quantenausbeute verringert. Ob sich dabei auch die Fluoreszenzüberlebenszeit änderte, muß durch entsprechende Messungen bestimmt werden. MgCl_2 ändert jedenfalls die Struktur der tRNAs.

3.3.2.2. Abhängigkeit der Wechselwirkungen zwischen tRNA und Synthetase von der KCl-Konzentration im Puffer

Die Ionenstärke-Abhängigkeit der Wechselwirkungen von Synthetase und tRNA wurden mit Ethidium-markierter tRNA in zwei Arten von Titrationsexperimenten untersucht:

1. $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ und $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ wurden mit beiden Synthetasen in Gegenwart und Abwesenheit von 0.1 M KCl im Phosphatpuffer titriert. Bei der höheren Ionenstärke war die Affinität jeweils geringer als bei niedriger Ionenstärke. PRS zeigte für $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ wie auch für $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ eine Bindungsstelle; die Anzahl tRNA-Bindungsplätze an SRS konnte nicht sicher bestimmt werden. Die beiden wesentlichen Ergebnisse sind: a) Die Anisotropie-Werte, die die Beweglichkeit der tRNA im Komplex mit der Synthetase charakterisieren (r_{∞}), waren deutlich von der Ionenstärke abhängig (siehe Tab. 2): tRNA wurde bei höherer Ionenstärke weniger stark an der Synthetase fixiert. b) $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ wurde eindeutig an PRS gebunden (Tab. 2).

$\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ konnte in Gegenwart von 0.1 M KCl nicht soweit mit SRS gesättigt werden, daß ein quantitativer Vergleich mit der entsprechenden Titration in Abwesenheit von KCl möglich war. Die

SRS-Affinität für tRNA_{EB}^{Phe} nahm mit steigender Ionenstärke sehr rasch ab.

Tab. 2

Anfangswerte (r_o) und Sättigungswerte (r_∞) der Anisotropie aus Titrationen von tRNA_{EB}^{Ser} mit Synthetase in Phosphatpuffer bei 24°C ohne und mit 0.1 M KCl; Werte aus Computeranpassungen der Titrationsparameter.

Titration	KCl (M)	r_o	r_∞
tRNA _{EB} ^{Ser} -SRS	0	0.186	0.241
	0.1	0.193	0.208
tRNA _{EB} ^{Ser} -PRS	0	0.199	0.282
	0.1	0.194	0.224
tRNA _{EB} ^{Phe} -PRS	0	0.176	0.280
	0.1	0.179	0.230

2. Mit Hilfe einer zweiten Art von Titrationen konnte der Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer tRNA-Bindung an SRS und PRS genau beobachtet werden. Hierzu wurde die Ethidium-markierte tRNA im Phosphatpuffer mit Synthetase gesättigt, und in dieser Lösung durch Zutitrieren von KCl die Ionenstärke erhöht. Aus Titrationen freier tRNA_{EB} mit KCl (siehe Abb. 16) und aus den Anpassungen für Titrationsendpunkte (Tabelle 2) konnten für verschiedene Ionenstärken die Werte von r_o und r_∞ abgelesen oder interpoliert werden. Die Bindungskonstante ließ sich dann aus dem Verhältnis freier und Synthetase-gebundener tRNA berechnen. Die Affinität von SRS für tRNA_{EB}^{Phe} nahm bei Erhöhung der KCl-Konzentration stärker ab als die Affinität für tRNA_{EB}^{Ser}. Bei PRS nahmen die Affinität für spezifische und unspezifische tRNA etwa gleichstark ab.

Die K-Werte wurden zusätzlich entsprechend einer Näherungsformel nach Debye und Hückel (101) ausgewertet. Auftragung von $\lg K$ gegen $\sqrt{\mu} / 1 - \sqrt{\mu}$ (mit μ = Ionenstärke) ergab Steigungen von circa - 10. In der Interpretation von Lofffield (6) bedeutet dies, daß etwa 5 Paare komplementärer Ladungen die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen beiden tRNAs und Synthetasen vermitteln.

Dieser Wert wurde auch aus der Abnahme der Bindungskonstante mit steigender Ionenstärke in Titrationsen erhalten, in denen tRNA^{Ser} zugesetzt und die SRS-Fluoreszenz gemessen wurden (siehe Abschn. 2.3.). Von Pingoud et al. (49) angegebene Werte für Bindungskonstanten von SRS und tRNA^{Ser} waren, nach der genannten Methode ausgewertet, ebenfalls mit der Abnahme von vier bis fünf Paaren komplementärer Ladungen vereinbar. Da verschiedene Voraussetzungen der Debye-Hückel-Theorie für die Wechselwirkungen zwischen Synthetasen und tRNAs nur näherungsweise erfüllt sind, kann das Ergebnis der Auswertung auch nur als Orientierung betrachtet werden.

Änderungen der Ionenstärke zeigten also hauptsächlich zwei Auswirkungen auf die Wechselwirkungen zwischen Synthetasen und tRNA:

1. Die Gleichgewichtskonstanten wurden mit steigender Salzkonzentration geringer. Man kann annehmen, daß sich die Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes aus Synthetase und tRNA vergrößerte.
2. Je höher die Ionenstärke, desto beweglicher war die an die Synthetase gebundene tRNA.

3.3.2.3. Abhängigkeit der Wechselwirkungen zwischen Synthetase und tRNA von der MgCl₂-Konzentration im Puffer

Zur Untersuchung des Einflusses von MgCl₂ auf die Wechselwirkungen zwischen Synthetase und tRNA wurden die Ethidium-markierten tRNAs zunächst mit den Synthetasen in Abwesenheit von MgCl₂ titriert. Daß tRNA^{Phe} auch in Abwesenheit von MgCl₂ mit ähnlicher Affinität wie in Gegenwart von 5 mM mgCl₂ an PRS gebunden wird, war aus den

Titrationen bekannt, in denen die Änderungen der Synthetasefluoreszenz beobachtet worden waren. Die SRS-Fluoreszenz hatte sich in Abwesenheit von MgCl_2 bei tRNA-Zusatz nicht geändert. Daß tRNA_{EB}^{Ser} doch an SRS gebunden wurde, zeigte sich am Anstieg der Fluoreszenzanisotropie von 0.18 auf 0.26 deutlich. Die Computeranpassung ergab zwei Bindungsplätze für tRNA^{Ser} an SRS und eine Bindungskonstante bei $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. In Abwesenheit von MgCl_2 wurde auch tRNA_{EB}^{Phe} an SRS und tRNA_{EB}^{Ser} an PRS gebunden.

Im zweiten Experiment wurde MgCl_2 zu Lösungen titriert, die Ethidium-markierte tRNA im Komplex mit Synthetase enthielten. Die Beweglichkeit des Fluorophors änderte sich entsprechend zwei möglichen Wirkungen von MgCl_2 : Als Salz schirmt MgCl_2 Ladungen an tRNA und Synthetase ab. Dadurch verringert sich die Affinität beider Substanzen zueinander. Mit dem Anteil gebundener tRNA sinkt auch die Fluoreszenzpolarisation. Als bivalentes Ion kann Mg^{++} auf die tRNA-Raumstruktur und deren Stabilität einwirken. Dies zeigte sich am Anstieg des Polarisationsgrades der Fluoreszenz von freier tRNA_{EB} bei Erhöhung der MgCl_2 -Konzentration (Abb. 16). Durch beide Wirkungen werden die Möglichkeiten der tRNA, sich an die Bindungsregionen der spezifischen und nicht spezifischen Synthetasemoleküle anzupassen, verändert (Abb. 17).

Sowohl bei SRS als auch bei PRS nahm mit steigender MgCl_2 -Konzentration die Fluoreszenzpolarisation der nicht spezifischen tRNA eher bzw. stärker ab als die Fluoreszenzpolarisation der spezifischen tRNA. Bei SRS erhöhte sich zunächst die Fixierung der tRNA bei Steigerung der MgCl_2 -Konzentration. An PRS wurden beide tRNAs schon in Abwesenheit von MgCl_2 so stark gebunden, daß sie nur abgekoppelt werden konnten. Zusatz von MgCl_2 zur Lösung erhöhte die Assoziationskonstante für SRS und tRNA^{Ser} wesentlich stärker als für PRS und tRNA^{Phe}. Dieser Unterschied kann dadurch erklärt werden, daß bei PRS und tRNA^{Phe} Salzwirkung und Konformationseffekte durch MgCl_2 einander annähernd kompensierten, während bei SRS und tRNA^{Ser} die Salzwirkung gegenüber der Erhöhung der Spezifität durch MgCl_2 zurücktrat.

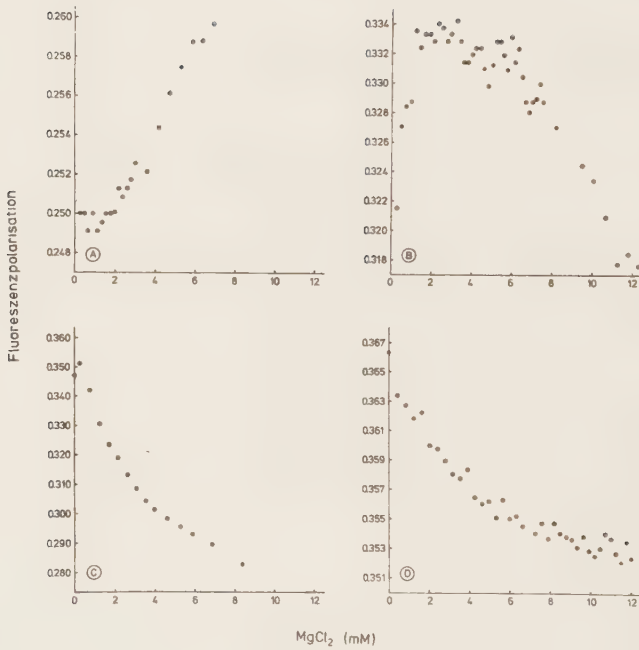


Abb. 17 Abhängigkeit der Fluoreszenzpolarisation des Komplexes aus Synthetase und tRNA_{EB}^{Ser} von der MgCl₂-Konzentration in Phosphatpuffer, bei 25° C

- (A): SRS 3×10^{-6} M, tRNA_{EB}^{Ser} 1×10^{-6} M. (B): SRS 3×10^{-6} M, tRNA_{EB}^{Phe} 1×10^{-6} M. (C): PRS 4×10^{-6} M, tRNA_{EB}^{Ser} 1×10^{-6} M. (D): PRS 4×10^{-6} M, tRNA_{EB}^{Phe} 1×10^{-6} M.

Bindung unspezifischer tRNA an PRS und Bindung von tRNA^{Phe} an PRS in Abwesenheit von $MgCl_2$ wurde auch in anderen Arbeitsgruppen beobachtet (30, 50).

3.4. Untersuchungen zur Topographie der tRNA-Bindungsstellen an Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

Die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche mit tRNA-Fragmenten sollten Vorstellungen über die Erkennungs- und Bindungsstelle(n) der tRNA für die Synthetase präzisieren.

Die Tertiärstruktur der tRNAs ist für deren biologische Aktivität sehr wichtig (91, 92, 102). Allerdings sind die bekannten tRNA-Moleküle in nicht denaturierter Form einander ähnlich: Sie enthalten alle zwischen 75 und 87 Nukleotide, die Kleeblattstruktur ist allen gemeinsam, sie kokristallisieren sogar (103). Die Hypothese, eine kurze Basensequenz werde von der Synthetase spezifisch erkannt, wurde durch Befunde unterstützt, wonach gewisse Oligonukleotide die Transferreaktion kompetitiv hemmten (104, 105). Unter anderem darauf ist die Annahme eines "zweiten genetischen Code" für die Wechselwirkungen zwischen Synthetasen und tRNA gegründet (106).

Welche Eigenschaften ein tRNA-Molekül besitzen muß, um spezifisch aminoacyliert zu werden, ist am genauesten für PRS bekannt (33): Die tRNA darf nicht denaturiert sein, die Basensequenzen des hU-Stammes müssen mit denen im hU-Stamm von tRNA^{Phe} übereinstimmen, an Position 73 muß sich ein Adenosin befinden, acht ist die optimale Anzahl Nukleotide in der hU-Schleife, n^2 -Methylierung des G in Position 10 erhöht die Aminoacylierungsgeschwindigkeit auf das Zehnfache. Zur Beladbarkeit tragen also Elemente der Tertiär-, der Sekundär- und der Primärstruktur gemeinsam bei.

Die Fluoreszenztitrationsen, über die nachstehend berichtet wird, erlaubten Aussagen über gegenseitiges Überlappen von Bindungsregionen für tRNAs an der Synthetase und ermöglichte, die Affinität von tRNA-Teilstücken zur Synthetase unabhängig von der Reaktion zu bestimmen.

3.4.1. Bindung von tRNA^{Ser}-Fragmenten an SRS in Gegenwart von assoziativ an das Fragment gebundenem EB

Mit Hilfe von assoziativ gebundenem EB konnte in Titrations Bindung von tRNA^{Ser}-Fragmenten an SRS beobachtet werden.

Der Polarisationsgrad von EB im Komplex mit dem etwa 50 Nukleotide langen Fragment Ser 37-85 lag erwartungsgemäß höher als der von Ser 1-36, das nur 36 Nukleotide enthält. Zu beiden tRNA^{Ser}-Teilstücken, die in einer Konzentration von 3 μ M vorgelegt wurden, wurde SRS bis zu einer Konzentration von 1×10^{-5} M titriert (siehe Abb. 18). Ser 37-85 war bei dieser SRS-Konzentration weitgehend mit Synthetase gesättigt, der Polarisationsgrad des EB-markierten Ser 1-36 stieg linear mit der SRS-Konzentration, ohne daß sich Sättigung andeutete. Bei Erhöhung der SRS-Konzentration blieb die Quantenausbeute von EB im Komplex mit Ser 37-85 konstant, mit Ser 1-36 stieg die Quantenausbeute etwas an.

Die im Vergleich zum kleineren tRNA^{Ser}-Fragment stärkere Bindung von Ser 37-85 an SRS kann durch die größere Anzahl ionisierter Phosphatreste am größeren Teilstück bedingt sein, aber auch dadurch, daß Elemente der Erkennungsregion für SRS in der S-Region, in T- -C-G-Stamm und -Schleife enthalten und erhalten sind: Diese Bereiche liegen in Ser 37-85 in Doppelhelix-Form vor oder sind von doppelhelikalen Bereichen eingeschlossen, sind also in sich stabil. Deshalb dürfte ihre Struktur der in intakter tRNA^{Ser} vorliegenden entsprechen. Innerhalb von Ser 1-36 kommen hierfür hU-Stamm und -Schleife in Frage.

Ser 37-85 wurde mit Phe 1-36, Ser 1-36 mit Phe 38-76 im Mengenverhältnis 1 : 1 gemischt. Die Lösungen wurden im Phosphatpuffer 1 Minute bei 70° C gehalten, und dann 10 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Danach hatten sich die tRNA^{Phe}-Fragmente mit Ser 1-36 bzw. Ser 37-85 zu Kombinationen zusammengelagert. Dies war daran zu erkennen, daß der Polarisationsgrad von EB im Komplex mit den Fragmentkombinationen höher lag als mit den entsprechenden tRNA^{Ser}-Fragmenten allein. Man nimmt an, daß Anticodon- und Akzeptor-Stamm die Bindung zwischen den tRNA-Fragmenten vermitteln, die dadurch eine stabile und der natürlichen ähnliche

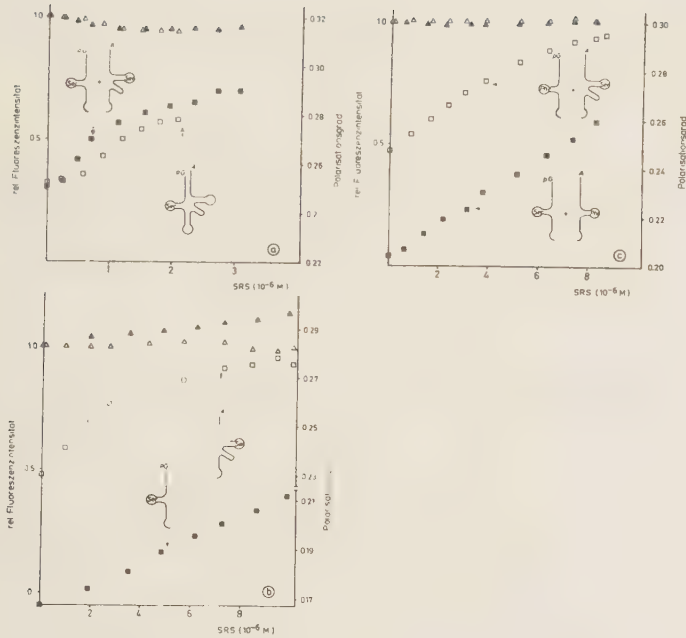


Abb. 18 Titrationen mit SRS im Phosphatpuffer bei 14°C von
 (a) tRNA^{Ser} und EB (leere Symbole) und der Kombination
 Ser 1-35/Ser 36-85 und EB (ausgefüllte Symbole),
 (b) Ser 1-35 und EB (ausgefüllte Symbole), Ser 36-85 und
 EB (leere Symbole), (c) Kombination Phe 1-36/Ser 36-85
 und EB (leere Symbole) und der Kombination Ser 1-35/Phe
 38-76 und EB (ausgefüllte Symbole).

EB-, tRNA- und Fragment-Konzentrationen betragen 2×10^{-6} M
 (a) und 3×10^{-6} M (b), (c).

(▲, △) relative Fluoreszenzintensität, (■, □) Polarisationsgrad.

Konformation ausbilden (107).

Die Bindung dieser Fragmentkombinationen an SRS war gegenüber der Bindung der entsprechenden tRNA^{Ser}-Fragmente jeweils für sich nicht wesentlich verändert. Der Polarisationsgrad von EB im Komplex mit der Fragmentkombination aus Ser 1-36 und Phe 38-76 stieg bei Zusatz von SRS stärker als mit Ser 1-36 allein. Die Fluoreszenzintensität wurde bei beiden Fragmentkombinationen durch SRS nicht geändert. Die sigmoide Zunahme des Polarisationsgrades, die mit tRNA^{Ser} bei SRS-Zugabe beobachtet wurde, trat nicht auf.

Auch die beiden tRNA^{Ser}-Fragmente wurden gemischt, erwärmt und in Gegenwart von EB mit SRS titriert. Abnahme der Fluoreszenzintensität und sigmoide Zunahme der Fluoreszenzpolarisation konnten hier ähnlich wie bei den Titrationsen intakter tRNA^{Ser} mit SRS beobachtet werden.

Die Verringerung der EB-Fluoreszenz bei intakter tRNA^{Ser} durch SRS war darauf zurückgeführt worden, daß die Synthetase EB aus einem tRNA^{Ser}-Bereich verdrängte. Anscheinend entstand erst bei der Zusammenlagerung von komplementären Teilen des Akzeptorstamms wie des Anticodonstamms der beiden tRNA^{Ser}-Fragmente die Bindungsstelle, woraus EB durch SRS verdrängt wurde. Da Fluoreszenzänderung und sigmoider Anstieg des Polarisationsgrades durch SRS bei intakter und im Anticodonbereich gespaltener tRNA^{Ser} sehr ähnlich waren, würde man die Bindungsstelle für Synthetase an tRNA^{Ser} eher am Akzeptorstamm als am Anticodonstamm vermuten; eine Unterbrechung der Nukleotidkette in der Anticodonschleife dürfte nämlich eher die Anticodonschleife und den Anticodonstamm als den Akzeptorstamm in Stabilität oder Konformation verändern. Ist tRNA^{Ser} an SRS gebunden, so werden Nukleotide des Akzeptorstammes vor Nukleaseangriff geschützt (108). Nukleotide des Akzeptorstammes sind also in der Nähe oder Teile einer Bindungsregion von tRNA^{Ser} für SRS. Es gibt allerdings - außer neueren Daten über tRNA^{Phe} (109) - keine Hinweise darauf, daß eine Spaltung der Kette in der Schleife die Struktur des zugehörigen Stammes verändert.

3.4.2. Konkurrenz von $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ mit tRNA^{Ser} -Fragmenten um Bindungsstellen an SRS

Die beiden tRNA^{Ser} -Fragmente wurden auch daraufhin untersucht, ob sie sie $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ von SRS verdrängen konnten. Abbildung 19A zeigt den Verlauf der Experimente: Zu einer $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ -Lösung wurde SRS titriert. Anisotropie und Polarisationsgrad der Ethidiumfluoreszenz stiegen bei konstanter Fluoreszenzintensität mit steigender SRS-Konzentration an. $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ wurde an SRS gebunden. Durch Zutritieren von tRNA^{Ser} , Ser 1-36 oder Ser 37-85 verringerte sich die Anisotropie wieder. $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ wurde also von SRS verdrängt. In Gegenwart eines etwa dreifachen Überschusses von tRNA^{Ser} über SRS war $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ nicht mehr meßbar an SRS gebunden. Durch die tRNA^{Ser} -Teilstücke konnte die Fluoreszenzanisotropie nicht auf den Wert freier $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ gesenkt werden. Ser 37-85 besaß eine größere Affinität zu SRS als Ser 1-36 und verringerte die Fluoreszenzanisotropie von $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ stärker. Damit bestätigten sich Ergebnisse aus den Titrationen der tRNA^{Ser} -Fragmente mit SRS in Gegenwart von assoziativ gebundenem EB.

3.4.3. Konkurrenz von $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ mit tRNA^{Phe} -Fragmenten um Bindung an PRS

In analoger Weise wie bei den tRNA^{Ser} -Fragmenten wurde die Bindung der tRNA^{Phe} -Hälften (Phe 1-36 und Phe 38-76) an PRS mit Hilfe von $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ untersucht (siehe Abb. 19B). $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ wurde zunächst an PRS gebunden und dann von PRS wieder verdrängt. Der stärkste Konkurrent war tRNA^{Phe} : Bei einem Konzentrationsverhältnis von 1 tRNA^{Phe} pro PRS war die Fluoreszenzanisotropie schon fast auf den Wert für freie $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ gesunken. Dagegen konnte Phe 38-76 selbst in 25fachem Überschuß über PRS $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ nicht völlig von PRS verdrängen. Phe 1-36 verhielt sich in den Konkurrenztitrationen eher wie intakte tRNA^{Phe} als Phe 38-76: Die Bindung war fast so stark wie die von tRNA^{Phe} , und $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ wurde durch Phe 1-36 fast vollständig von PRS verdrängt.

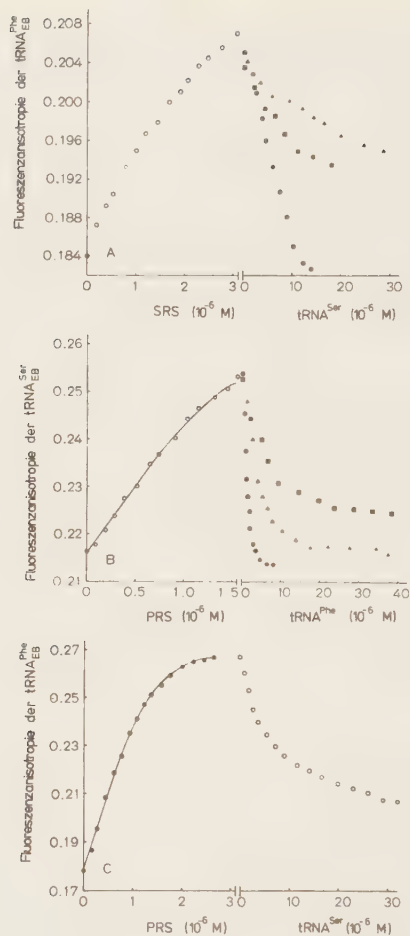


Abb. 19 (A) Titrations von tRNA_{EB}^{Phe} (1×10^{-6} M, ○) mit SRS, und des Komplexes mit tRNA_{EB}^{Ser} (●), Ser 36-85 (■) und Ser 1-35 (▲).

(B) Titrations von tRNA_{EB}^{Ser} (1×10^{-6} M, ○) mit PRS, und des Komplexes mit tRNA_{EB}^{Phe} (●), Phe 38-76 (■) und mit Phe 1-36 (▲).

(C) Titration von tRNA_{EB}^{Phe} (1×10^{-6} M, ●) mit PRS, und des Komplexes mit tRNA_{EB}^{Ser} (○), Phosphatpuffer, 25°C.

Sowohl von tRNA^{Ser} als auch von tRNA^{Phe} konnte sich nur je ein Molekül an PRS anlagern. Der Befund, daß $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ durch tRNA^{Phe} ganz, durch die tRNA^{Phe} -Hälften nur teilweise von PRS abgedrängt wurde, läßt sich am besten unter der Annahme mehrerer Kontaktstellen zwischen tRNA und Synthetase erklären.

3.4.4. Konkurrenz von $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ mit tRNA^{Ser} um Bindung an PRS

tRNA^{Phe} beanspruchte an PRS einen Bereich, der zumindest für eine Bindung von $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ an PRS notwendig war. Möglicherweise konnte tRNA^{Phe} bei PRS zusätzlich an Regionen gebunden werden, die für tRNA^{Ser} nicht zugänglich waren. Für das entsprechende Konkurrenzexperiment war zu berücksichtigen, daß tRNA^{Phe} fünf- bis zehnmals stärker an PRS gebunden wurde als tRNA^{Ser} .

$\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ (1 μM) wurde mit PRS gesättigt, dann wurde tRNA^{Ser} zutitriert (Abb. 19C). Bei 30 μM tRNA^{Ser} war die Fluoreszenzanisotropie auf einen Wert gesunken, der einem Viertel PRS-gebundener und drei Vierteln freier $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ entsprach, Sättigung der PRS mit tRNA^{Ser} war noch nicht erreicht.

Dieses Ergebnis zeigte, daß tRNA^{Ser} und tRNA^{Phe} bei PRS an dieselben Regionen gebunden werden. Analoge Experimente mit SRS brachten ein ähnliches Resultat. Methionyl-tRNA-Synthetase aus E. coli wurde von Blanquet et al. (51a) mit $\text{tRNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ und $\text{tRNA}_{\text{m}}^{\text{Met}}$ titriert. Die Löschung der Enzymfluoreszenz durch beide tRNAs war nicht additiv. Möglicherweise schließt auch bei Methionyl-tRNA-Synthetase die Bindung eines tRNA-Moleküls das nächste von der Bindung aus. Nimmt man keine allosterischen Mechanismen an, so bedeutet dies, daß beide tRNAs an überlappenden Enzymregionen gebunden werden.

2. Untersuchungen zur Kooperativität der Bindung von tRNA^{Ser} an SER

Aus der Literatur sind einige Versuche bekannt, sigmoide Bindungskurven für die Substratbindung an Proteine zu erklären. In allen Erklärungen wird angenommen, daß das Protein verschiedene Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität zum Substrat besitzt. Darüber, wie sich die Bindungsstellen auf die Proteinmoleküle verteilen, gibt es verschiedene Vorstellungen.

Häuser versuchte (102) (110), das Bindungsgleichgewicht zwischen Hämoglobin und Sauerstoff unter der Annahme zu beschreiben, Hämoglobin besitze vier verschiedene Bindungsplätze und die Konzentrationen dieser Bindungsplätze seien konstant und gleich groß. Zehn Jahre später regte Pauling an (111), als molekulares Substrat für Änderung von Bindungskonstanten Änderungen der Proteinkonformation zu betrachten. 1965 wurde von Monod, Wyman und Changeux ein Modell vorgeschlagen (112), in dem zwei Konformationen eines oligomeren Proteins zueinander im dynamischen Gleichgewicht stehen. Aus Symmetriegründen sollten in einem Proteinmolekül jeweils alle Untereinheiten die gleiche Konformation besitzen. Nach Koshland, Némethy und Filmer (1966, 113) verursacht die Bindung des ersten Liganden an einen Proteinuntereinheit Konformationsänderungen ("induced fit"), die Wechselwirkungen der betroffenen Untereinheit mit benachbarten Untereinheiten ändern sich. Der nächste und weitere Liganden können andere Konformationen hervorrufen und mit unterschiedlicher Stärke gebunden werden. Für verschiedene Anordnungen der Untereinheiten wurden die Sättigungsfunktionen dieses sequentiellen Modells aufgestellt. Folger hätte das Symmetriemodell und ein sequentielles Modell zu einem allgemeinen Schema zusammen (114). Man muß annehmen, daß oligomere Enzyme mit ihren freien Enzymuntereinheiten im Gleichgewicht stehen. Ist die Affinität für ein Substrat davon abhängig, ob die Untereinheiten frei oder aneinander gebunden sind, so können sigmoide Sättigungskurven entstehen. Für das Gleichgewicht zwischen oligomeren Enzymen und freien Untereinheiten die Sättigungsgleichung auf (115,

Bei den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen gibt es Hinweise auf Konformationsänderungen und auf Assoziationsgleichgewichte. Der Ausgangspunkt für die Annahme von Konformationsänderungen war der Befund (116), daß bei einigen Synthetasen die Aminosäure-Aktivierung weniger spezifisch erfolgt als die Transfer-Reaktion. So zeigten Baldwin und Berg (117), daß das Valyl-AMP-Anhydrid, das sich an der Isoleucyl-tRNA-Synthetase bilden konnte, hydrolysiert wurde sobald tRNA^{Ile} der Lösung zugesetzt wurde. Möglicherweise induzierte tRNA^{Ile} am Synthetasmolekül eine spezifischere Konformation.

Assoziation von Synthetase-Untereinheiten wurde ebenfalls beschrieben. 1969 wiesen Lee und Muench (64) nach, daß die Untereinheiten von Prolyl-tRNA-Synthetase durch Erwärmung oder Glycerinzusatz zum aktiven Dimer reassoziieren. Neuerdings berichtete Parfait (118) über Dimerisierung der Untereinheiten von Arginyl-tRNA-Synthetase aus *B. stearothermophilus* in Gegenwart von tRNA^{Arg}, die bei Sucrose-Gradienten-Zentrifugation zu beobachten war. Heider et al. (56) diskutierten aufgrund von Gleichgewichts-Zentrifugationsversuchen, daß SRS aus Bäckerhefe in Untereinheiten dissoziieren könne.

Es sind also bei Synthetasen Hinweise auf Konformationsänderungen und auf Assoziation von Untereinheiten gefunden worden. Auffällig ist, daß bisher keine Kooperativität beobachtet wurde. Aufgrund unserer Befunde stellte sich umgekehrt das Problem, herauszufinden, ob Konformationsänderungen oder Assoziation von Synthetase-Untereinheiten die kooperative Bindung verursachte.

4.1. Durchführung und Auswertung

Zwischen verschiedenen Modellen für Konformationsänderungen zu unterscheiden oder unter verschiedenen Modellen für Assoziation von Enzymuntereinheiten das zutreffende auszuwählen erfordert viele Meßpunkte hoher Genauigkeit über einen großen Konzentrationsbereich und umfangreiche statistische Analysen (119). Leichter läßt sich entscheiden, ob ein kooperatives Bindungsverhalten auf Konformationsänderungen oder auf Änderungen eines Assoziationsgleichgewichts des Enzyms

zurückzuführen ist: Nur die Lage eines Assoziationsgleichgewichts ist in Abwesenheit von Substrat und in Gegenwart sättigender Substratmen-gen von der Enzymkonzentration abhängig.

Für den Test, ob SRS seine Eigenschaften konzentrationsabhängig ändert, wurde als Methode die Messung der Aminoacylierungsgeschwindigkeit gewählt. SRS sollte tRNA-gesättigt vorliegen. Wegen der hohen notwendigen tRNA-Konzentrationen war es nicht vorteilhaft, die Fluoreszenz von SRS als Meßgröße zu benutzen. War die biologische Aktivität von SRS konzentrationsabhängig, so konnte dies als Hinweis auf eine mögliche Regelung in vivo durch die Synthetasekonzentration gewertet werden.

Die SRS-Aktivität wurde bei 21°C unter Standardbedingungen (jedoch in Abwesenheit von Albumin) bei verschiedenen SRS-Konzentrationen gemessen. Die Inkubationszeit wurde jeweils so gewählt, daß nicht mehr als 5 % der eingesetzten tRNA^{Ser} beladen wurden. Die spezifische Aktivität von SRS nahm in Konzentrationen unter 10⁻⁷M deutlich umso weiter ab, je verdünnter das Enzym eingesetzt war. Bei Konzentrationen zwischen 10⁻⁹ und 10⁻¹⁰ M betrug die spezifische SRS-Aktivität etwa 15 % derjenigen bei 10⁻⁷.

Für die Auswertung (Abb. 20) wurde angenommen, daß sich je zwei SRS-Einheiten zu einem Dimer zusammenlagern können. In der Lösung steht die monomere Form (M) mit der dimeren (D) im Gleichgewicht:

$$K = \frac{(M)^2}{(D)} \qquad 4.2./1$$

K bedeutet die Gleichgewichtskonstante. Je höher konzentriert das Enzym vorlag, desto mehr verschob sich das Gleichgewicht zugunsten der dimeren Form, die durch die spezifische Aktivität A_D charakterisiert war. Die monomere Form besaß die spezifische Aktivität A_M. Der jeweilige Anteil Dimerer an der Gesamtkonzentration, Y, läßt sich aus A_M, A_D und der jeweils gemessenen spezifischen Aktivität, A_{bem.}, berechnen:

$$Y = \frac{A_{\text{gem}} - A_M}{A_D - A_M}$$

4.2./2

Daraus, wie Y sich mit der Enzymkonzentration ändert, kann die Gleichgewichtskonstante abgeschätzt werden.

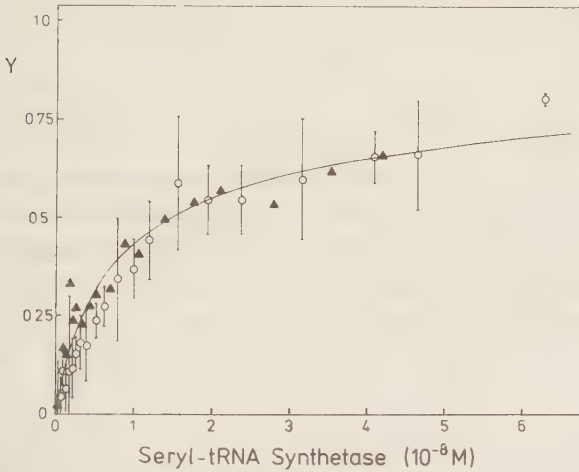


Abb. 20 Abhängigkeit der SRS-Aktivität von der SRS-Konzentration

(○) geben die harmonisch gemittelten Werte der Synthetasekonzentration und von Y an, Standardabweichungen wurden eingezeichnet. Die durchgezogene Linie entspricht $K = 3 \times 10^{-8} \text{ M}$ (Bedeutung: siehe Text). Standardtest, 21° C , kein Albuminzusatz, tRNA^{Ser} -Konzentration $3 \times 10^{-5} \text{ M}$. (▲) gleiche Bedingungen wie oben, jedoch wurde bei gleicher Akzeptorkapazität für Serin unfractionierte Hefe-tRNA eingesetzt; tRNA-Konzentration etwa $3 \times 10^{-4} \text{ M}$.

In Abbildung 20 wurde Y gegen die SRS-Konzentration im Testgemisch aufgetragen. Das beschriebene Experiment wurde mit fünf SRS-Präparaten durchgeführt. Die einzelnen Punkte geben Mittelwerte der Enzymkonzentrationen für die Meßwerte in harmonisch wachsenden Konzentrationsbereichen, und die in diesen Bereichen harmonisch gemittelten Y-Werte an. Die durchgezogene Linie entspricht einem K von

$3 \times 10^{-8} \text{ M}$.

Erhöhung der Ionenstärke von 0.1 auf etwa 0.25 M mit KCl verdoppelte die Enzymaktivität über den ganzen untersuchten Konzentrationsbereich. Die Enzymkonzentration bei halbmaximaler Aktivität war nicht deutlich abhängig von der KCl-Konzentration.

4.2. Kontrollen

In dünner Lösung sind Enzyme durch Adsorption an die Wände der Reaktionsgefäße und durch inaktivierende Verunreinigungen aus den Puffersubstanzen sehr gefährdet. Tatsächlich könnte eine durch Adsorption oder durch Verunreinigungen verursachte Proteindenaturierung die beobachtete Konzentrationsabhängigkeit der Aktivität teilweise simulieren. Doch spricht gegen diese Hypothese, daß die spezifische Aktivität von SRS bei geringen Konzentrationen gegen etwa 10 % der Maximalaktivität und nicht gegen Null ging.

Um inaktivierende Verunreinigungen zu binden wird oft Serum-Albumin in hoher Konzentration als sogenanntes Schutzprotein benutzt. Zusatz von reiner Aldolase bis zu 2.4 mg/ml und Zusatz von Serum-Albumin bis 2.5 mg/ml wurden auf ihren Schutzeffekt mit Schutzprotein-freien Aktivitätsbestimmungen verglichen. In Gegenwart von Serum-Albumin war die SRS-Konzentration, bei der Y 0.5 betrug, auf etwa $0.8 \times 10^{-8} \text{ M}$ verschoben, und die maximale Beladungsgeschwindigkeit um etwa 50 % erhöht. Aldolase änderte die Abhängigkeit der Aktivität von der SRS-Konzentration nicht. Die Aktivitätssteigerung durch Albumin kann den vermuteten unspezifischen Schutzeffekt darstellen. Die Abhängigkeit der Aktivität von der SRS-Konzentration änderte sich nicht wesentlich. Allerdings lag K im Bereich von 10^{-9} M .

Um inaktivierende Proteinadsorption an Wände der Reaktionsgefäße abschätzen zu können, wurden Glas- und Eppendorf-Plastikröhrchen als Reaktionsgefäße verglichen. Im SRS-Konzentrationsbereich von 2.5×10^{-10} bis $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ lag die berechnete spezifische Aktivität bei Tests in Chromschwefelsäure-gereinigten Glasröhrchen um 20 % niedriger als bei Tests in inerten Plastikröhrchen, bei höheren SRS-Konzentra-

tionen wurden die Unterschiede noch geringer.

Bei den Synthetase- und Substratkonzentrationen im Standardenzymtest liegt SRS mit tRNA zu etwa 99 %, mit L-Serin und ATP jeweils in der Größenordnung von 50 % gesättigt vor (60). Konnte eine Abhängigkeit der spezifischen Aktivität eines Enzyms, wie sie Abbildung 20 zeigt, nicht schon durch den geringen Sättigungsgrad mit Aminosäure und ATP bei einem einfachen Enzymmechanismus auftreten? Eine einfache Kontrollrechnung erlaubte, diese Möglichkeit auszuschließen:

Es sei E_o die eingesetzte Enzymkonzentration, S_o die eingesetzte Substratkonzentration, und C die in der Lösung vorliegende Konzentration an gebundenem Substrat bzw. mit Substrat gesättigten Bindungsstellen am Enzym. K sei die Assoziationskonstante. Dann gilt:

$$K = \frac{C}{(nE_o - C)(S_o - C)} \quad 4.3./1$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist proportional zu C , die spezifische Enzymaktivität proportional zu C/nE_o . Auflösung nach C/nE_o ergibt:

$$\frac{C}{nE_o} = \frac{(S_o - C)}{(S_o - C) + 1/K} \quad 4.3./2$$

Solange $1/K$ viel kleiner als die Konzentration an freiem Substrat, ($S_o - C$), ist, wie im Fall der tRNA, ist C/nE_o , das heißt, alles Enzym gesättigt. Da die Konzentrationen von L-Serin und ATP im Standardtest von der gleichen Größenordnung sind wie ihr K_m -Wert, ist also für C/nE_o ein Wert irgendwo in der Mitte zwischen Null und Eins zu erwarten. Jedoch wird dieser Wert für verschiedene Enzymkonzentrationen konstant sein, solange C wesentlich kleiner als S_o bleibt. Diese Bedingung war in den gezeigten Versuchen eingehalten: ATP lag gegenüber dem Enzym bei Annahme von 10 Bindungsstellen (44) in mindestens 1000fachem, L-Serin (2 Bindungsstellen (60)) in mindestens 125fachem Überschuß vor. Wächst, etwa durch Erhöhung der Enzymkonzentration, der Anteil des ATP oder L-Serins, der als C gebunden vorliegt, so verringert sich C/nE_o , kann aber nicht ansteigen, wie es Abbildung 20 für SRS zeigt.

Die Reaktionskinetik von SRS in Abhängigkeit von L-Serin und ATP kann nicht mit einfachen Modellen beschrieben werden; kooperative Mechanismen wurden diskutiert (60). Daß L-Serin oder ATP ein mögliches Assoziationsgleichgewicht bei SRS verschieben kann, ist nicht auszuschließen.

5. Diskussion

5.1. Auswertung der Experimente

Für die Auswertung der Titrationsen (vgl. Abschn. 2.2.) können die Koordinatenwerte eines jeden Meßpunkts in die Sättigungsgleichung eingesetzt werden, die vier unbekannte Größen enthält: Assoziationskonstante, Anzahl Bindungsstellen, sowie Fluoreszenz des freien und des gebundenen Enzyms. Dieses Gleichungssystem mit vier Meßwertpaaren algebraisch zu lösen war nicht sinnvoll, weil die Meßpunkte um durchschnittlich 0.2 bis 0.5 % von der durch Computeranpassungen erhaltenen Hyperbel abwichen.

Es wurde die von Marquardt (120, 121, 122) entwickelte Methode zur nicht-linearen Optimierung gewählt; sie besitzt mehrere Vorzüge: Die flexible Strategie, nach der die Kurve mit der geringsten Abweichung von den Meßwerten erhalten wird, gewährleistet kurze Rechenzeiten und schützt recht wirksam davor, daß lokale Minima mit unwahrscheinlichen Werten aufgesucht werden. Das Anpassungsprogramm ist auch davon unabhängig, ob Gleichgewichts- oder Geschwindigkeitskonstanten für einfache oder komplizierte Modellvorstellungen ermittelt werden sollen. Sogar verschiedene Modelle miteinander zu vergleichen ist möglich. Aus der Abhängigkeit der gesuchten Größe von der Güte der Anpassung wird die Sicherheit der gefundenen Werte (Varianz, T-Wert, 95 %-Vertrauensgrenzen) berechnet, zur Kontrolle systematischer Fehler werden die Differenzen zwischen Meßwerten und errechneten Werten grafisch dargestellt (Residualplot).

Verschiedene Arbeitsgruppen bedienten sich anderer Methoden, um Titrationsen auszuwerten. Zum Teil wurden die Werte für n und K aus Scatchard-Auftragungen entnommen (z. B. 38, 40). Zum Teil wurden nur n und K in Anpassungsprogrammen variiert (44), obwohl Ausgangs- und Endwert der Fluoreszenz - wie bei den hier vorgelegten Experimenten - nur mit endlicher Genauigkeit bestimmt werden konnten. Zum Teil wurden nur ganzzahlige Werte für n zugelassen (49, 50). Diese

Methode reicht aus, wenn während des Experiments die Anzahl fluoreszierender Moleküle gleich der Anzahl der zur normalen Wechselwirkung befähigten Moleküle ist, und wenn diese Anzahl bekannt ist. Schon bei Anwesenheit relativ weniger Moleküle mit anderen Bindungseigenschaften wird allerdings so der Wert der Assoziationskonstante verfälscht. Die von uns benutzte Methode erlaubt Rückschlüsse auf Anteile verschieden stark bindender Moleküle und zugleich korrekte Bestimmung der Assoziationskonstante.

Einen anschaulichen Begriff von der Zuverlässigkeit der hier vorgelegten Anpassungswerte für n und K kann man durch Vergleich mit Bindungsstudien über Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase (123) erhalten: Cornish-Bowden und Koshland zeigten (119), daß bei etwa gleicher Meßgenauigkeit, wie sie in dieser Arbeit erreicht wurde, 20 bis 25 Meßpunkte genügten, um unwahrscheinliche von möglicherweise zutreffenden Modellen kooperativer Bindung zu unterscheiden. Die Anpassungswerte dürften in der vorliegenden Arbeit ungefähr so sicher bestimmt sein wie in (119), weil sich einerseits jede Anpassung auf 35 bis 40 Meßwerte stützen konnte, andererseits aber drei Tatsachen die Auswertung komplizierten: 1. I_{∞} wurde relativ sicherer bestimmt als I_0 und n , weil - methodisch bedingt - die Meßpunkte umso dichter lagen, je höher die Ligandenkonzentration war. 2. Im Anpassungsprogramm wurden nicht drei (wie in (119)), sondern vier Größen variiert. 3. Da unter gewissen Bedingungen für die Bindung von tRNA^{Ser} an SRS sigmoide Sättigungskurven beobachtet wurden, traf eine Grundannahme für das Anpassungsmodell nicht zu, nämlich nur eine Klasse gleicher und unabhängiger Bindungsplätze an SRS. (Sigmoide Bindungskurven lassen sich erst durch zweierlei Bindungsstellen erklären, die aufeinander einwirken können.) War die Sättigungskurve deutlich sigmoid, so wurde deshalb keine Anpassung versucht. Geringfügige Abweichungen von der Hyperbelform der Bindungskurve könnten allerdings unbemerkt geblieben sein und die Sicherheit der Anpassungsergebnisse verringert haben.

5.2. Vergleich der benutzten Methoden

Die Bindung von tRNA an Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wurde mit Hilfe von Gleichgewichts-, Relaxations- und Aktivitätsmessungen untersucht. Je nach Methode beleuchteten die Ergebnisse verschiedene Aspekte dieser Bindung. Ein Vergleich der Resultate soll im folgenden zu einer kritischen Beurteilung der benutzten Methoden und zu einer möglichst umfassenden Vorstellung über die Wechselwirkungen zwischen tRNA und Synthetasen führen. Exemplarisch werden die Wechselwirkungen zwischen tRNA^{Ser} und SRS diskutiert.

5.2.1. Titrationsen, bei denen Änderungen der Synthetasefluoreszenz ausgewertet wurden

In SRS-Titrationsen mit tRNA^{Ser} zeigte sich bei verschiedenen KCl-Konzentrationen: 1. Die Assoziationskonstante nahm mit steigender KCl-Konzentration ab. Mit Hilfe der Auswertung nach Lofffield (6), die von der Debye-Hückel-Theorie (101) und ihren Annahmen ausgeht, ließ sich abschätzen, daß etwa fünf Ladungspaare die Bindung zwischen tRNA^{Ser} und SRS vermitteln. Bei anderen Synthetasen waren zwischen vier und acht Ladungspaare abgeleitet worden (6). 2. Je höher die KCl-Konzentration, desto geringer war der Anteil der SRS-Fluoreszenz, der durch Bindung an tRNA^{Ser} gelöscht wurde.

Die Verringerung der Fluoreszenzlöschung ließ nur den Rückschluß zu, daß sich bei verschiedenen KCl-Konzentrationen die Komplexe aus tRNA^{Ser} und SRS voneinander unterschieden. Die Frage, worin sie sich unterschieden, konnte aus zwei Gründen nur mit Hilfe der genannten Daten allein nicht beantwortet werden: 1. Wenn sich die Fluoreszenzausbeute von SRS (im Komplex mit tRNA^{Ser}) änderte, so änderte sich die Summe der Fluoreszenz aller 12 Tryptophanreste. Wieviele davon ihre Fluoreszenzausbeute vermehrten und verringerten, ist sehr schwierig zu bestimmen. Ein Weg führt möglicherweise über genaue Messung des Abklingens der Fluoreszenz (69). 2. Wenn sich die Fluoreszenzausbeute des einzelnen Tryptophanrests änderte, so konnten sich das Dipolmoment seiner unmittelbaren Umgebung und/oder die

Möglichkeiten zu strahlungsloser Energieübertragung geändert haben (37, 68). Außer mit Hilfe sehr detaillierter Röntgen-kristallographischer Untersuchungen können Lage und Umgebung der einzelnen Tryptophanreste im Proteinmolekül kaum bestimmt werden.

5.2.2. Titrationsen, bei denen die Fluoreszenzpolarisation Ethidiummarkierter tRNA ausgewertet wurde

Titrationen, bei denen $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ in Gegenwart verschiedener KCl-Konzentrationen mit SRS gesättigt und die Änderungen der Fluoreszenzpolarisation ausgewertet wurden, ergaben 1. nach der Auswertung entsprechend (101), daß etwa fünf Ladungspaare den Komplex aus tRNA^{Ser} und SRS stabilisieren. Damit wurde ein Resultat der SRS-Titrationsen mit tRNA^{Ser} bestätigt. 2. $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ behielt bei Bindung an SRS etwa gleiche Quantenausbeute wie im freien Zustand. Daraus läßt sich ableiten, daß die dreidimensionale Struktur von $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ sich in unmittelbarer Umgebung des Fluorophors nicht wesentlich änderte, wenn die tRNA mit der Synthetase in Wechselwirkung trat. Mit Hilfe von Fluorophoren, die an anderen definierten Stellen ins tRNA-Molekül eingebaut sind, könnte man die tRNA-Bereiche eingrenzen, an denen intensive Wechselwirkungen mit der Synthetase stattfinden. 3. Mit steigender Ionenkonzentration sanken auch p_{∞} und r_{∞} , was bedeutet, daß im Komplex mit der Synthetase die Bewegungsfreiheit der tRNA zunahm. Wenn das tRNA^{Ser} -Molekül bei geringer Ionenstärke fest an den spezifischen Bindungs- und Reaktionsort fixiert war, so war es in Puffern mit höher konzentriertem KCl weniger fest daran gebunden. In Gegenwart von ATP und L-Serin sollte deshalb tRNA^{Ser} umso langsamer aminoacyliert werden, je mehr Salz der Puffer enthielt.

5.2.3. Bindungskinetik von $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ und SRS

Die Geschwindigkeitskonstanten der Bindung von $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ an SRS wurden mit Hilfe des Temperatursprung-Apparats von Rigler et al. (52) bestimmt. Relaxationsmessungen von Rigler et al. (127 c) und von

Pingoud et al. (49) ergaben übereinstimmend unter anderem folgendes: Mit steigender Ionenstärke nahm die berechnete Gleichgewichtskonstante ab; je höher die KCl-Konzentration war, desto rascher dissoziierten entstandene Komplexe aus tRNA und Synthetase, außerdem verlangsamte sich die Assoziationsgeschwindigkeit etwas. Da die Überlebenszeit eines Komplexes bei großen Gleichgewichtskonstanten im wesentlichen durch die Dissoziationsgeschwindigkeit bestimmt wird, war also die tRNA mit steigender Ionenstärke jeweils immer kürzer am SRS-Molekül fixiert. Bei Sättigung der Synthetase mit tRNA mußte mit steigender Ionenstärke der tRNA-Umsatz ansteigen, in Gegenwart der übrigen Substrate sollte sich die Beladungsgeschwindigkeit erhöhen.

5.2.4. Messung der Aminoacylierungsgeschwindigkeit

Die biologisch wichtige Eigenschaft der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ist die spezifische Beladung der tRNA mit Aminosäure. Untersuchungen über das Bindungsgleichgewicht und die Bindungskinetik von Synthetasen und tRNA können mit Aussagen über die Bindungsparameter zum Verständnis des Mechanismus der Aminoacylierung beitragen. Erlaubten die Ergebnisse aus Kinetik- und Gleichgewichtsuntersuchungen zusammengenommen eine hinreichende Voraussage über die biologische Aktivität?

Auf den ersten Blick könnte es so aussehen, als würden die Titrationsergebnisse den Ergebnissen der Relaxationsmessungen widersprechen: Aufgrund der Experimente, bei denen die Beweglichkeit Ethidium-markierter tRNA beobachtet wurde, war anzunehmen, daß mit steigender KCl-Konzentration die Aminoacylierungsgeschwindigkeit sinken würde. Überlegungen über die Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes hatten zum entgegengesetzten Schluß geführt.

Bei genauerem Hinsehen wird jedoch deutlich, daß die Schlußfolgerungen einander ergänzen: Die Ergebnisse der Temperatursprung-Experimente beziehen sich auf die Frequenz der Komplexbildungen zwischen tRNA und Synthetase, die Daten der Titrationen auf die Reaktionswahr-

scheinlichkeit für jeden entstandenen Komplex. Tatsächlich läßt sich die Anfangsgeschwindigkeit der Aminoacylierung als Produkt aus der Häufigkeit der Komplexbildungen und der Komplexqualität auffassen:

$$\frac{\text{Anzahl Reaktionen}}{\text{Zeiteinheit}} = \frac{\text{Anzahl Komplexbildungen}}{\text{Zeiteinheit}} \times \frac{\text{Anzahl Reaktionen}}{\text{Komplexbildung}} \quad 2.4./1$$

Es wurde angenommen, daß beide Faktoren Hyperbelfunktionen der Ionenkonzentration sind, weil sowohl die Häufigkeit der Komplexbildungen als auch die Reaktionswahrscheinlichkeit bei niedrigen Ionenkonzentrationen von endlichen Werten ausgehen und bei hohen Ionenkonzentrationen nur endliche Werte erreichen können. Die Multiplikation der beiden gegenläufigen Hyperbelfunktionen ergibt eine einfache Gleichung der folgenden Form:

$$\frac{\text{Anzahl Reaktionen}}{\text{Zeiteinheit}} = \frac{m}{Am^2 + Bm + C} ; \quad 2.4./2$$

Darin bedeutet m die Ionenkonzentration, die Koeffizienten A, B und C stellen verschiedene Funktionen der eingesetzten Enzym- und Substratkonzentrationen unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen dar.

Mit steigender Ionenkonzentration werden die komplementären Ladungspaare an tRNA^{Ser} und SRS mehr und mehr abgedeckt. Dadurch erreichen beide Bindungspartner mehr Bewegungsfreiheit gegeneinander, und deshalb erhöht sich die Dissoziationsgeschwindigkeit. Je weniger präzise das tRNA-Molekül an die Synthetase fixiert wird, und je rascher es wieder abdiffundiert, desto weniger wahrscheinlich wird eine spezifische Aminoacylierung erfolgen. Andererseits erhalten umso mehr tRNA-Moleküle die Chance zur Reaktion, je rascher jedes die Synthetase verläßt. Offenbar (siehe Abb. 4) sind keine weiteren Annahmen zu einer ausreichenden Beschreibung der KCl-Abhängigkeit der SRS-Aktivität nötig.

Diese Feststellung gilt auch für PRS, da analoge Gleichgewichts- und Aktivitätsuntersuchungen entsprechende Resultate erbrachten wie bei SRS und tRNA^{Ser}.

Es sei erwähnt, daß der aufsteigende Schenkel der Maximumkurve sehr steil sein kann, so daß bei über 0.1 M ansteigender Ionenstärke die Aktivität nur noch absinkt. Dieser Befund ergab sich bei Vergleichsexperimenten mit Valyl-tRNA-Synthetase und tRNA^{Val}, sowie mit PRS und tRNA^{Phe}_{HCl} (persönl. Mitteilung von W. Wintermeyer).

5.3. Abhängigkeit der Affinität und Reaktionsgeschwindigkeit von der Ionenstärke

Wenn auch die Dissoziationsgeschwindigkeit der tRNA und die Qualität der tRNA-Bindung unter gewissen Bedingungen das Aktivitätsverhalten der Synthetase vollständig erklären können, so ist doch nicht bewiesen, daß dies geschieht. Wodurch könnte die Synthetaseaktivität sonst Ionenstärke-abhängig verändert werden?

Die Aminosäure muß, bevor sie auf eine tRNA übertragen werden kann, aktiviert werden. Die Geschwindigkeit der Aminosäure-Aktivierung - so wurde mehrfach gefunden (65, 124, 125) - variiert mit der Salzkonzentration wenig oder gar nicht. Allenfalls bei hohen Salzkonzentrationen kann sich dieser Reaktionsschritt etwas verlangsamen (126). Man kann deshalb annehmen, daß sich die Enzymkonformation nicht wesentlich änderte, wenn die Ionenstärke in gewissen Grenzen geändert wurde. Dies dürfte auch für SRS gelten, da sich die SRS-Fluoreszenz bei Erhöhung der KCl-Konzentration nicht änderte.

In Lösungen mit sehr niedriger Ionenstärke lösen sich Proteine nur in sehr geringer Konzentration. Nahm die Konzentration aktiver Synthetase noch deutlich zu, wenn die Ionenstärke über 0.1 M erhöht wurde?

Die Konzentration aktiver Synthetase sollte dementsprechend bei Erhöhung der Salzkonzentration zunächst ansteigen. Der Befund, daß die Anzahl Bindungsstellen pro SRS dabei abnimmt, läßt sich ebenso schwer damit in Einklang bringen, wie die monotone Abnahme des r_{∞} -Wertes mit ansteigender Salzkonzentration. Da SRS und PRS bei über 30 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung ausgefällt werden - unter anderem bedient man sich dieser Eigenschaft zur Reindarstellung der Synthetase -, wird möglicherweise bei sehr hohen Salzkonzentrationen die Aminoacylie-

rungsgeschwindigkeit aufgrund eingeschränkter Löslichkeit der Synthetase verringert.

Einen Hinweis auf das Vorliegen verschiedener tRNA-Konformationen bei verschiedenen Salzkonzentrationen enthielten die Titrations Ethidium-markierter tRNAs mit $MgCl_2$ und KCl . Mit Hilfe der Annahme, daß die Synthetasebindung einer tRNA in verschiedenen Konformationen unterschiedlich ist, ließe sich erklären, daß der r_{∞} -Wert, der die Fixierung der tRNA im Synthetase-Komplex charakterisiert, mit steigender Ionenkonzentration abnahm. Die Verringerung der Anzahl tRNA-Bindungsstellen an SRS von zwei auf eine ließe sich dann mit der zusätzlichen Annahme erklären, daß die tRNA-Konformation, die bei höherer Ionenstärke vorliegt, überwiegend an einer Bindungsstelle der Synthetase gebunden wird. Bei bindungskinetischen Experimenten hätten dann allerdings mehrere Relaxationszeiten beobachtet werden müssen (40, 49). Vielleicht bewirkt ein dem Aminoacylierungsschritt vorgelagertes Gleichgewicht zwischen verschiedenen tRNA-Konformationen einen Teil der schwer erklärbaren Befunde der Aminoacylierungskinetik (60). Bislang war es nicht möglich, gering unterschiedliche tRNA-Konformationen zu finden und zu untersuchen, weil die vorliegenden Methoden entweder nur größere Änderungen zu erkennen erlaubten (zum Beispiel Absorptionsmessungen (127) und enzymatische tRNA-Spaltungen (11, 128), oder (wie zum Beispiel assoziative Bindung von Fluorophoren an tRNA (41) und Enzymkinetik (60)) zu keinen eindeutigen Ergebnissen verhalfen. Mit Hilfe von tRNA-Molekülen, die an definierten Stellen geeignete Fluorophore kovalent gebunden tragen (53), können auch geringfügig verschiedene tRNA-Konformationen charakterisiert werden.

Eine Funktion von der Form der Gleichung 2.4./2 kann für die Reaktionsgeschwindigkeit abgeleitet werden (z. B. 114), wenn man annimmt, daß zwischen Bindung an der Synthetase und Aminoacylierung der tRNA eine Konformationsumwandlung im Komplex stattfinden muß, daß die Geschwindigkeit der Komplexdissoziation proportional zur Ionenkonzentration ist, und daß Assoziation und Dissoziation nur in demselben Konformationszustand beider Moleküle erfolgen können. Außerdem muß angenommen werden, daß die Aminoacylierung die Bindungseigenschaften

der tRNA nicht verändert. Die letztgenannte Bedingung ist für SRS und tRNA^{Ser} wohl erfüllt (49). Die bisherigen Ergebnisse aus Relaxationsmessungen haben keine Hinweise auf eine Konformationsumwandlung des Komplexes ergeben (40, 49). In einem Wechselwirkungsmodell für SRS und tRNA^{Ser} sollte berücksichtigt werden, daß an SRS zwei tRNA-Bindungsplätze mit verschiedenen Eigenschaften gefunden wurden (129).

Aufgrund der hier vorgelegten Resultate ist anzunehmen, daß die Synthetasen die aktivierte Aminosäure nur auf einen mit steigender Ionenstärke abnehmenden Anteil spezifisch gebundener tRNA überträgt, daß sich also die Qualität der tRNA-Bindung an die Synthetase mit steigender Ionenstärke verringert. Für PRS und SRS könnte damit erklärt werden, wodurch die Aminoacylierungsgeschwindigkeit in neutraler Lösung bei einer Ionenstärke von 0.1 M limitiert wird (15, 49). Unter diesen Bedingungen liegen sowohl die Geschwindigkeit der Aminosäureaktivierung als auch die Dissoziationsgeschwindigkeit der aminoacylierten tRNA deutlich höher als die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion. Möglicherweise trifft die Schlußfolgerung für viele Synthetasen zu; bisher ist nämlich keine Synthetase beschrieben worden, die unter den genannten Bedingungen die Gesamtreaktion annähernd so rasch wie die Aminosäureaktivierung katalysiert.

5.4. Nicht-ionische Wechselwirkungen und Spezifität

Die Ionenstärke besitzt große Bedeutung für die Stärke der tRNA-Bindung an Synthetasen und für die Aminoacylierungsgeschwindigkeit. Allerdings dürften über die Spezifität der Aminoacylierung weitere Faktoren mitentscheiden. Unsere Ergebnisse zur Charakterisierung dieser Faktoren bestätigen im wesentlichen früher erhobene Befunde (29 - 31, 130): Fremde tRNAs werden meist nur um 5 bis 100mal schwächer an die Synthetase gebunden als die spezifisch zugehörige tRNA. Die spezifischen Wechselwirkungen tragen also nur wenig zur gesamten Bindungsenergie bei. Die Reaktionsgeschwindigkeit bei PRS aus *E. coli* und der homologen tRNA^{Phe} hängt sehr stark von einer Methylgruppe an einer Base, G in Position 10, ab (31). Wahrscheinlich entstehen

also spezifische Wechselwirkungen zum Teil mit Hilfe von van der Waals'schen Kräften, die geringe Reichweite besitzen. Mit dieser Vorstellung im Einklang ist auch die Hypothese (69), daß aromatische Aminosäurereste der Synthetase zwischen bestimmten Nukleotiden der spezifischen tRNA interkalieren, und so die tRNA in einer bestimmten Position festhalten.

Möglicherweise sind spezifische und unspezifische Wechselwirkungen zwischen tRNA und Aminoacyl-tRNA-Synthetase sowohl dem Beitrag zur Bindungsenergie als auch ihrer chemischen Natur nach verschieden. Entscheidende Ergebnisse hierzu können wohl gewonnen werden, wenn die Synthetase-Struktur untersucht und Struktur-, Bindungs- und Reaktionsanalyse gemeinsam eingesetzt werden.

6. Versuchsbeschreibung und benutzte Substanzen

6.1. tRNA- und Synthetasepräparate, sonstige Substanzen

Unfraktionierte tRNA aus Brauereihefe war von Boehringer GmbH Mannheim bezogen. tRNA^{Phe} und die tRNA^{Phe}-Fragmente, von R. Thiebe, hatten die in (128) beschriebenen Eigenschaften. tRNA^{Ser} und die tRNA^{Ser}-Teilstücke, von F. Fittler, waren isoliert und gereinigt wie in (107) veröffentlicht; das Fragment Ser 45-85 war von P. Philippsen isoliert (135). Die Ethidium-markierten tRNAs, von W. Wintermeyer, sind in (53, 89) charakterisiert.

Die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen PRS (E. C. 6.1.1.20) und SRS (E. C. 6.1.1.11) waren aus Sacch. cerevisiae Carlsbergensis (gezogen und in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet bei Fa. Merck, Darmstadt) isoliert und gereinigt von R. Hirsch mit Assistenz von R. Lamm und G. Kwiatkowski nach (40, 54).

Zur Konzentrationsberechnung der tRNAs aus Absorptionsmessungen in Küvetten von 1 cm Lichtweg, bei Raumtemperatur, wurden folgende molare Extinktionskoeffizienten benutzt: tRNA^{Ser} 7.1×10^5 , tRNA^{Phe} 6.25×10^5 , Ser 37-85 4.5×10^5 , Ser 1-36 3.5×10^5 , Ser 45-85 4.1×10^5 , Phe 38-76 3.4×10^5 , Phe 1-36 3.25×10^5 , tRNA^{Ser}_{EB} 7.45×10^5 und tRNA^{Phe}_{EB} 6.55×10^5 .

Für SRS wurde ein Molekulargewicht von 120 000 d (56), für PRS 240 000 d (131) angenommen. 1 A₂₈₀-Einheit entsprach 0.82 mg SRS und 1.0 mg PRS.

EB war von Boots Pure Drug Co. Ltd., Nottingham, England, bezogen. PF stammte aus The British Drug Houses, Poole, Dorset, England.

6.2. Durchführung der Titrationen

Um den Liganden zur Titrandenlösung zuzusetzen, wurden Hamilton-Spritzen (Sarnen, Schweiz) mit Volumina von 10 bis 100 μ l mit einem

Repetieradapter benutzt, der die eingesetzte Spritze in 50 gleichen Volumen-Portionen entleert. Damit die einzige Konzentration, die sich im Verlauf einer Titration änderte, die Ligandenkonzentration war, enthielten die Lösungen in der Küvette und die in der Spritze gleichen Puffer und gleiche Titrandenkonzentration.

Die Spritze, die die Ligandenlösung enthielt, wurde senkrecht über der Küvette mit einer Spiralfeder in einer Höhe gehalten, daß ein Teflonmischkolben, der auf die Spitze der Kanüle gesteckt wurde, gerade so tief in die Meßlösung eintauchte, daß seine untere Fläche nicht den Strahlengang erreichte, und die obere noch unter der Oberfläche der Lösung blieb. Gegenüber anderen Methoden Lösung zuzugeben und zu mischen, die versucht wurden, wie Zusatz und Mischung mit gleichen oder verschiedenen Eppendorf-Pipetten, Zusatz mit Hamilton-Spritze und Mischen mit Teflonrührstab, oder Zusatz mit Hamiltonspritze und Mischen mit Stickstoffdurchperlung, zeichnete sich die beschriebene Methode dadurch aus, daß sie am besten reproduzierbar und am einfachsten durchzuführen war, daß die Quantenausbeute der Synthetasen durch den Mischvorgang nicht verringert wurde, und daß keine unerwünschten und unkontrollierbaren Volumenverluste auftraten.

Titriert wurde in Quarzküvetten mit quadratischem Querschnitt, innere Seitenlänge 4.4 mm (Hellma, Müllheim), die in einem entsprechend bemessenen Küvettenhalter an der Stelle der Temperatursprung Meßzellen in das thermostatisierte Küvettenhaus des Fluoreszenzspektrophotometers eingesetzt wurden.

6.3. Apparative Hilfsmittel für Titrationsen

Das für die Titrationsen benutzte Spektrofluorometer ist in (52) beschrieben, siehe aber auch Abbildung 21. Mit Hilfe einer Hg-Xe-Hochdrucklampe ("Compact Arc", 90181, 200 W. Hanovia Canrad Precision Ind. Inc., Chestnut St., Newark, N.J., U.S.A.) und eines hoch auflösenden Gittermonochromators (Bausch & Lomb Inc., Rochester, New York, U.S.A.) wurden Tryptophan- und Proteinfluoreszenz mit Licht

der Wellenlänge 280 nm, die Fluoreszenz von PF, EB und tRNA_{EB} mit Licht der Wellenlängen 455 nm (PF) und 546 nm (EB, tRNA_{EB}) angeregt. Die Fluoreszenzintensität wurde nach Durchtritt durch 3 mm dicke Kantenfilter (Schott & Gen., Mainz) WG 320 und UG 11 (Tryptophan, Protein), GG 495 (PF) und OG 590 (EB, tRNA_{EB}) gemessen mit geeigneten EMI- und RCA-Photomultiplikatoren (52). Zur Polarisierung des Anregungslichts wurde ein Kalkspat-Glan-Thompson-Prisma (Dr. Steeg & Reuter GmbH, Bad Homburg vdH.), als Analysatoren wurden KS-W78-Folien (Polarex Käsemann, Opt. Werkstätten GmbH, Oberaudorf) eingesetzt. Der an die Meßzelle angeschlossene Thermostat (TUK 30D, Meßgeräte-Werk Lauda/Tauber, Dr. Wobser KG) hielt die Temperatur der Flüssigkeit in der Küvette auf $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ konstant, wie mit einem Thermistor und geeichter Meßbrücke mehrfach kontrolliert wurde.

Absorptionsmessungen wurden in der üblichen Kombination des Monochromators M4Q III und des Anzeigegeräts PMQ II der Fa. Zeiss, Oberkochen, durchgeführt. Fluoreszenzspektren wurden in einem Farrand Spektrofluorometer gemessen.

Titrationsanpassungen und die Korrektur für tRNA-Absorption wurden mit Hilfe eines IBM 360/75 Computers, die Kurvensimulierungen der Abbildungen 4 und 9 mit einem ND 812 -Computer (Nuclear Data, Ireland, Ltd.), verbunden mit Teletype und Hewlett-Packard-XY-Recorder 7004B, durchgeführt.

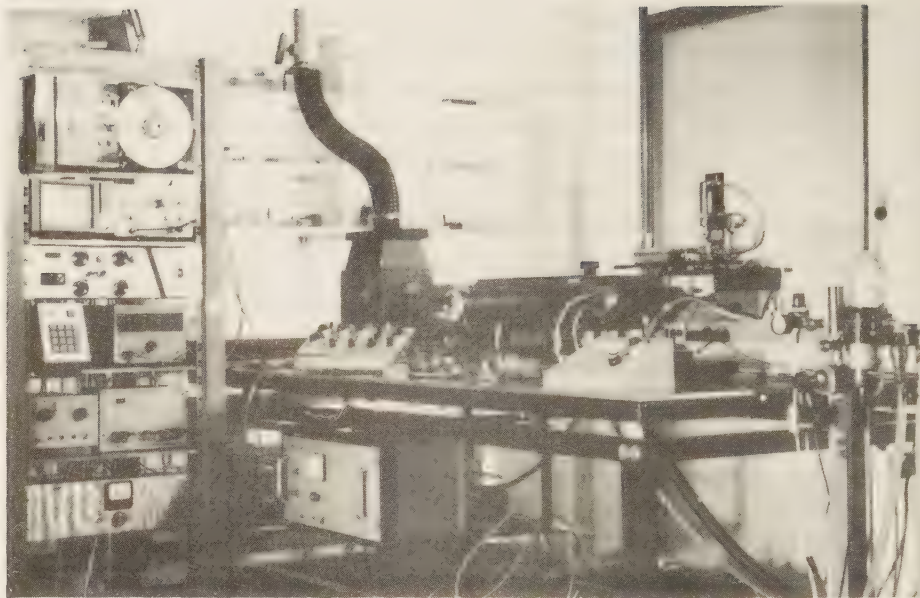


Abb. 21 Meßanordnung für die Fluoreszenztitrationen und für relaxationskinetische Experimente (52)

Links: Registrierelektronik (von oben: Lochstreifenstanze, Oszilloskop mit schnell registrierender Gedächtniseinheit, Simulator, Tastatur und Digitalvoltmeter, unten Spannungsregler für die Photomultiplikatoren); Bildmitte: Lampengehäuse (mit Belüftung), Schaltpult für Signalverstärkung und Nullabgleichung, unter dem Tisch Kondensator für Temperatursprung-Experimente; vom Lampengehäuse nach rechts: Monochromator, Küvettenhaus mit Photomultiplikatoren für die Messung von Lampenintensität, Fluoreszenz und Transmission; Temperaturmeßbrücke; rechts: Stopped flow-Gerät mit Druckluftventilen.

6.4. Korrektur der Proteinfluoreszenz für Nukleinsäureabsorption

Daß tRNA in dem Wellenlängenbereich, in dem Tryptophan zur Fluoreszenz angeregt werden kann, stark absorbiert, kompliziert alle Experimente, in denen Proteinfluoreszenz in Gegenwart von Nukleinsäuren beobachtet wird. Die Fluoreszenzverringierung aufgrund dieses inneren Filtereffekts hängt, außer vom Lambert-Beer'schen Gesetz auch von der Geometrie des benutzten Apparats ab. Ergebnissen von Ehrenberg et al. (132) folgend, wurden bei den jeweils verwendeten Apparat-Einstellungen Modellexperimente durchgeführt, in denen sich die Tryptophanfluoreszenz nur aufgrund von Absorption durch zutritierte Nukleinsäure verringerte. Als Modellsubstanzen wurden ATP und Tryptophan gewählt, die bei den eingesetzten Konzentrationen und Pufferbedingungen nicht in meßbarem Ausmaß Komplexe bildeten (133).

Für die Fluoreszenz F , die den Photomultiplikator erreicht, gilt:

$$F(k) \sim \int_0^d e^{-kx} \omega(x) dx \quad 6.4./1$$

d bedeutet Küvettenlänge, k das Produkt aus molarem Extinktionskoeffizient und Konzentration der absorbierenden Substanz, x bezeichnet den in Rechnung gezogenen Küvettenabschnitt. Da der Raumwinkel variiert, unter dem der Photomultiplikator von verschiedenen Punkten der Küvette aus erscheint, wird ein Gewichtungsfaktor $\omega(x)$ eingeführt.

Um die in Titrationen gemessene Fluoreszenz für die Absorptionsbedingte Verringerung in jedem Punkt i zu korrigieren, muß der Fluoreszenzmeßwert mit einem Korrekturfaktor $G(k_o, k_i)$ multipliziert werden:

$$G(k_o, k_i) = \frac{F(k_o)}{F(k_i)} \quad 6.4./2$$

Aus den Tryptophantitrationen mit ATP wird $\omega(x)$ als Funktion von $k \cdot d$ berechnet, wobei $\omega(x)$ im Anpassungsprogramm als Polynom mit unbekannten Koeffizienten ausgedrückt wurde:

$$\omega(x) = \sum_{n=0}^N a_n t^n; \quad t = k/d, \quad n = 0, 1, 2, \dots \quad 6.4./3$$

Andere Arbeitsgruppen haben versucht, für die Absorptionskorrektur verschiedene Grenzbedingungen aufzusuchen, unter denen sich die Korrektur vereinfacht: Die Tryptophanfluoreszenz kann mit Licht von über 300 nm Wellenlänge noch angeregt werden (44). Werden gewisse Nukleinsäurekonzentrationen nicht überschritten, so ist die Korrektur für den inneren Filtereffekt vernachlässigbar gering. - Die Referenztitration kann mit denselben Synthetase- und tRNA-Konzentrationen wie in der zu korrigierenden Titration ausgeführt werden, jedoch unter Pufferbedingungen, unter denen zwischen Synthetase und tRNA keine Bindung stattfindet (49). Der Korrekturfaktor wird bei dieser Methode direkt für jeden Meßpunkt aus den gemessenen Fluoreszenzwerten erhalten. - Anzunehmen, $\omega(x)$ sei für die ganze Küvettenbreite konstant (z. B. 38, 39), führt zu:

$$G(k_o, k_i) = \frac{k_i}{k_o} \cdot \frac{1 - e^{-k_o d}}{1 - e^{-k_i d}} \quad 6.4./4$$

Nach dieser Formel zu korrigieren hatte für die in der vorliegenden Arbeit benutzte Meßanordnung, besonders bei hoher optischer Dichte, eine zu geringe Korrektur zur Folge.

6.5. Aktivitätstest

Der Test für die Synthetaseaktivität wurde durchgeführt, wie in (40) beschrieben. Im Unterschied zum Standardtest (134) wurde das Reaktionsgemisch 5 oder 15 Minuten inkubiert. Um die Synthetaseaktivität vor und nach Titration zu vergleichen wurden Tests mit gleicher Synthetasekonzentration herangezogen. Nicht mehr als 10 % der tRNA sollte aminoacyliert sein. Die Aktivität wurde bei 24° C und zum Teil auch bei 37° C gemessen und verglichen. Jeder Meßpunkt wurde im Triplikat bestimmt. Das Reaktionsröhrchen enthielt in 0.1 ml: 20 A₂₆₀-Einheiten unfractionierte Hefe-tRNA (Boehringer Mannheim GmbH), 2.5 nMol ¹⁴C-Serin bzw. -Phenylalanin (Sigma, St. Louis, Mo. U.S.A., "Sigma grade", und The Radiochemical Centre, Amersham, England), 0.5 uMol ATP (Dinatriumsalz, von Papierwerke Waldhoff-Aschaffenburg und von Sigma, St. Louis, "Sigma grade"), 5 µMol

MgCl₂, 2 µg Serumalbumin und verschiedene Verdünnungen des Synthetasepräparats. Die Trichloressigsäure-fällbare Radioaktivität wurde auf Whatman GF/C-Filtern von der freien Aminosäure getrennt. Die Filter wurden durch Wärme getrocknet, und in Toluolszintillator (4 g Omnifluor in 1 l dest. Toluol) in Tricarb 3310-, 3375- oder 2425-Szintillationszählern (Packard Instruments) bestimmt.

Als Einheit der Enzymaktivität ist die Synthetasemenge definiert, die unter Bedingungen des Standardtest 1 µMol tRNA pro Minute mit Aminosäure belädt.

6.6. Analytische Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgelen

Die Durchführung der Disk-Elektrophorese ist in (135) ausführlich beschrieben.

Die tRNA-Fragmente und -Fragmentkombinationen wurden in 0.3 cm dicken Trenngelen aus 16 % Acrylamid und 1.3 % Bisacrylamid in 7 M Harnstoff getrennt; ein Tris/Veronal-Puffersystem mit pH 8.9 (136) wurde dafür verwendet. Aliquots von 0.05 bis 0.1 A₂₆₀-Einheiten der Fragmente wurden 1 : 2 mit einer 0.005 % wäßrigen Lösung von Bromphenolblau in 7 M Harnstoff, 50 % Saccharose verdünnt und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Nach der Trennung wurden die Banden mit "all stain"-Farbstoff angefärbt.

Für die densitometrische Auswertung wurde der Untergrund durch Belichten mit einer Tageslichtlampe entfärbt. Die Extinktion wurde bei 546 nm gemessen. Innerhalb bestimmter Konzentrationsgrenzen der Fragmente ist die Fläche eines Gipfels im Densitogramm proportional der Nukleotidmenge (135). Die Gesamtmenge eines Fragments kann nur relativ zu anderen Banden desselben Gelstreifens angegeben werden.

6.7. Puffer, sonstiges

Der "Phosphatpuffer", wie in (40) angegeben, enthielt: 0.03 M Kaliumphosphat pH 7.3 (KOH), 5 mM MgCl_2 , 0.5 mM Na-EDTA (Titriplex III), 1 mM red. Glutathion, 10 % (v/v) Glycerin. Der "Cacodylatpuffer", wie in (40) angegeben, enthielt: 0.02 M Ammoniumcacodylat pH 7.2, 5 mM Na-EDTA, 15 mM MgCl_2 , 1 mM red. Glutathion (alle von Fa. Merck, Darmstadt, "pro analysi"; die Reinheit von Natriumcacodylat, das von The British Drug Houses, Poole, Dorset, England, bezogen wurde, war nicht geringer als 97 %. Die freie Säure wurde von H. S. Hertz zur Verfügung gestellt.) Salze zur Einstellung bestimmter Ionenstärken waren ebenfalls im Reinheitsgrad "pro analysi" von Fa. Merck, Darmstadt, bezogen.

Die Synthetasen wurden in Puffern ohne MgCl_2 isoliert, die 0.5 mM EDTA enthielten (57). Aus tRNA war Mg^{++} durch Dialyse gegen Wasser mit 1 M NaCl und 10 mM EDTA (137) entfernt.

Die Glasröhrchen für Aktivitätsbestimmungen wurden, über die für alle Glaswaren angewendete maschinelle Reinigung hinaus mit Chromschwefelsäure gereinigt. Küvetten wurden teils mit Chromschwefelsäure, teils mit Lauge, destilliertem Wasser und Methanol (purissimum, Kebo AB, Stockholm, Schweden) gereinigt.

Das benutzte Wasser war deionisiert und anschließend doppelt quarzdestilliert.

7. Zusammenfassung

Die Wechselwirkungen zwischen Aminoacyl-tRNA-Synthetase und tRNA bestimmen die Präzision des Translationsschrittes in der Proteinbiosynthese. Darüber hinaus sind sie als Modell von Interesse, da spezifische Interaktionen zwischen Proteinen und Nukleinsäuren an vielen Stellen des Stoffwechsels entscheidende Bedeutung besitzen.

Die Synthetase-tRNA-Wechselwirkungen wurden mit zwei Fluoreszenzmethoden untersucht. Ausgangspunkt für die erste Methode war der Befund, daß sich freie und tRNA-gesättigte Synthetase in der Intensität ihrer Tryptophanfluoreszenz unterscheiden. Aus der Synthetasefluoreszenz in Titrationsen der Synthetase mit tRNA konnten die Bindungskonstante und die maximale Anzahl gebundener tRNA bestimmt werden. Bei der zweiten Methode wurde die Fluoreszenzpolarisation Fluorophor-markierter tRNA gemessen. Da freie tRNA rascher diffundiert als Synthetase-gebundene, und da die Fluoreszenzpolarisation ein empfindliches Maß für die Rotationsdiffusionsgeschwindigkeit darstellt, konnten auch aus der Fluoreszenzpolarisation der tRNA in Titrationsen der tRNA mit Synthetase die Bindungsparameter berechnet werden. Die Berechnungen wurden mit Hilfe eines Computerprogramms für nichtlineare Parameteranpassung durchgeführt. Da Phenylalanyl- und Seryl-tRNA-Synthetase (PRS, SRS), tRNA^{Phe} , tRNA^{Ser} , die Fluorophor-markierten tRNAs ($\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$, $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$) und verschiedene tRNA-Fragmente rein zur Verfügung standen, konnten die spezifischen und unspezifischen Wechselwirkungen untersucht und Anhaltspunkte über Eigenschaften der Bindungsregionen und die chemische Natur der Wechselwirkungen zwischen Synthetase und tRNA gewonnen werden.

In Kontrollexperimenten konnte sichergestellt werden, daß die Enzymaktivität während Titrationsen nicht wesentlich abnahm und daß die Bindung Fluorophor-markierter tRNAs sich von der Bindung der nativen tRNAs an die Synthetasen nicht wesentlich unterschied.

Für die Komplexe der tRNA mit der jeweils spezifischen Synthetase wurden im Phosphatpuffer bei 25°C Stabilitätskonstanten von etwa $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ gemessen. SRS zeigte für tRNA^{Ser} zwei Bindungsplätze.

PRS für tRNA^{Phe} einen Bindungsplatz. Bei Titrationen von SRS mit tRNA^{Ser} wurde bei Temperaturen unter 10°C ein sigmoider Sättigungsverlauf gefunden. Als Erklärung für diese Sigmoidität wurde eine Assoziation der Untereinheiten des Synthetasmoleküls zum Dimer oder eine Assoziation der Dimeren zu tetrameren Molekülen aufgrund des Befundes angenommen, daß die spezifische Aktivität von SRS mit steigender Enzymkonzentration zunahm.

tRNA^{Ser} wurde auch an PRS, tRNA^{Phe} auch an SRS gebunden. Die Assoziationskonstanten für diese unspezifischen Wechselwirkungen zwischen tRNA und Synthetase lagen fünf- bis zehnmal niedriger als für die spezifischen Wechselwirkungen. Die Zahl der Bindungsstellen an der Synthetase für tRNAs war in Titrationen jeder der beiden Synthetasen mit der zugehörigen und mit fremder tRNA gleich.

Hinweise auf Eigenschaften der Bindungsregionen der Synthetasen ergaben sich aus Experimenten, in denen die Konkurrenz verschiedener tRNAs bzw. tRNA-Fragmente um Bindungsplätze an den Synthetasen untersucht wurde. $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ konnte durch tRNA^{Phe} vollständig aus der Bindung an PRS verdrängt werden, auch PRS-gebundene $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ konnte durch tRNA^{Ser} verdrängt werden. Daraus wurde gefolgert, daß die Bindungsregionen der spezifischen und unspezifischer tRNA an der Synthetase überlappen. An der Bindung einer tRNA an Synthetase sind mehrere, zum Teil voneinander unabhängige Wechselwirkungsorte beteiligt. Dies wurde aus Konkurrenzversuchen mit tRNA-Fragmenten geschlossen. Durch Sättigung der Synthetasen mit bestimmten Teilstücken der spezifischen tRNA wurde die Bindung der unspezifischen tRNA nicht vollständig aufgehoben, jedoch ihre Beweglichkeit im Komplex mit der Synthetase erhöht. Das tRNA^{Phe} -Fragment Phe 1-36 wurde an PRS fast so stark wie tRNA^{Phe} gebunden und war als Kompetitor gegen $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Ser}}$ fast ebenso effektiv wie tRNA^{Phe} , während Phe 38-76 in der Bindung und als Kompetitor wesentlich schwächer war. Von den tRNA^{Ser} -Fragmenten wurde Ser 37-85 stärker an SRS gebunden und verdrängte $\text{tRNA}_{\text{EB}}^{\text{Phe}}$ effektiver von SRS als Ser 1-36.

Hinweise auf die chemische Natur der Wechselwirkungen zwischen Synthetase und tRNA konnten aus Bindungsexperimenten gewonnen wer-

den, in denen die Bindungsparameter unter verschiedenen Pufferbedingungen bestimmt wurden. Die Stabilität homologer und heterologer Komplexe nahm mit steigender KCl-Konzentration stark ab, die Affinität war bei pH 5.5 wesentlich größer als in neutraler Lösung. Möglicherweise bestimmen die Wechselwirkungen des Enzyms mit den Phosphatgruppen der tRNA die Stärke des unspezifischen Anteils der Bindung. Zur Ausbildung der spezifischen Wechselwirkungen mit SRS muß tRNA^{Ser} in der durch Mg⁺⁺-Ionen stabilisierten Raumstruktur vorliegen.

Bindungsstärke und Reaktionsgeschwindigkeit sind bei Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und tRNAs einander nicht proportional. Dies zeigte sich daran, daß mit steigender Ionenstärke die Bindungskonstante für Synthetase und tRNA monoton abnahm und im Komplex mit Synthetase das tRNA-Molekül immer freier beweglich wurde, während die Aminoacylierungsgeschwindigkeit auf ein Maximum anstieg und wieder abnahm. Dieses Verhalten kann auftreten, wenn zumindest zwei Faktoren, die sich mit steigender Ionenstärke ändern, die Synthetaseaktivität bestimmen. Als solche Faktoren kommen die Dissoziationsgeschwindigkeit der tRNA, Konformationsänderungen der tRNA, der Synthetase und - abgeleitet aus den Befunden über die tRNA-Beweglichkeit im Komplex mit Synthetase - verschiedene Reaktionswahrscheinlichkeit pro Komplexbildung in Betracht.

Summary

The interactions between aminoacyl tRNA-synthetases and tRNA determine the precision of the translational step in protein biosynthesis. Moreover, they are of interest as a model for specific interactions between proteins and nucleic acids which play an important role in the metabolism and regulation of the cell.

The synthetase tRNA-interactions were investigated by the use of two fluorescence methods. The first method was based upon the finding that free synthetase and synthetase saturated with tRNA differed in the intensity of their tryptophan fluorescence. By measuring the synthetase fluorescence in titrations of the synthetase with tRNA the binding constant and the maximal number of bound tRNA molecules per synthetase could be determined. The second method consisted in measuring the fluorescence polarization of fluorophore labelled tRNA. Free tRNA diffuses faster than synthetase bound tRNA. As the fluorescence polarization is a sensitive measure of the rotational diffusion velocity the binding parameters could also be calculated from the values of the tRNA fluorescence polarization in titrations of the tRNA with synthetase. For the calculations, a computer program for non-linear parameter estimation was used. Purified phenylalanyl and seryl tRNA-synthetase (PRS, SRS), tRNA^{Phe}, tRNA^{Ser}, the fluorophore labelled tRNAs (tRNA^{Phe}_{EB}, tRNA^{Ser}_{EB}) and a number of defined tRNA fragments were used in order to investigate the specific and unspecific interactions and to get information on properties of the binding regions and the chemical nature of the interactions between aminoacyl tRNA-synthetase and tRNA.

In control experiments it could be ascertained that the synthetase activity did not decrease appreciably during titrations and that the binding of fluorophore labelled tRNA did not differ from the binding of the unmodified tRNAs to the synthetase.

For the complexes of tRNA^{Phe} and tRNA^{Ser} with their cognate synthetase stability constants of about $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, in phosphate buffer at 25°C were determined. SRS showed two binding sites for tRNA^{Ser},

PRS one binding site for tRNA^{Phe}. From titrations of SRS with tRNA^{Ser}, at temperatures below 10° C, sigmoidal saturation curves were obtained. This sigmoidicity of the saturation curves can be caused by an association of the subunits of SRS to form the dimers or an association of the dimers to give tetrameric molecules because the specific activity of SRS increased with increasing enzyme concentration.

tRNA^{Ser} was also bound to PRS, tRNA^{Phe} to SRS. The association constants for these unspecific interactions between tRNA and synthetase were five to ten times lower than those for the specific interactions. The number of tRNA binding sites on the synthetase was equal in titrations of each synthetase with the cognate and the noncognate tRNA.

Information on properties of the binding regions of the synthetases were obtained from experiments in which the competition of different tRNAs and tRNA fragments for the synthetases was investigated. tRNA^{Ser}_{EB} bound to PRS could be completely replaced by tRNA^{Phe} and likewise, PRS bound tRNA^{Phe}_{EB} was replaced by tRNA^{Ser}. From this it was concluded that the binding regions for the cognate and the noncognate tRNA on the synthetase overlap. More than one and partly independent interaction sites are involved in the binding of one tRNA to a synthetase. This was concluded from competition experiments with tRNA fragments. The binding of noncognate tRNA to the synthetase was not completely eliminated by saturating the enzyme with certain fragments of the cognate tRNA. The mobility of the noncognate tRNA in the complex with the synthetase, however, was increased. The tRNA^{Phe} fragment Phe 1-36 was bound to PRS almost as strongly and competed against tRNA^{Ser}_{EB} almost as effectively as tRNA^{Phe} while Phe 38-76 was bound not as strongly and was not as effective as a competitor. Of the tRNA^{Ser} fragments, Ser 37-85 was bound more strongly to SRS and competed more effectively against tRNA^{Phe}_{EB} at SRS than Ser 1-36.

Some information of the chemical nature of the interactions between synthetase and tRNA could be gained from binding experiments in which the binding parameters were determined under different buffer conditions. The stability of homologous and heterologous complexes de-

creased strongly with increased KCl-concentrations, the affinity was greater at pH 5.5 than in neutral solutions. Possibly, interactions of the enzyme with the phosphate groups of the tRNA determine the binding energy of the unspecific interactions. In order to be able to perform the specific interactions with SRS tRNA^{Ser} must first obtain a Mg⁺⁺-ion stabilized tertiary structure.

With increasing ionic strength the binding constant for synthetase and tRNA decreased continuously and the tRNA in complex with the synthetase became more mobile while the rate of aminoacylation increased up to a maximum and then decreased. Such a behaviour is conceivable if there are at least two ionic strength dependent factors which determine the enzymatic activity. The rate of dissociation of the tRNA, conformational changes of the tRNA or of the synthetase can be considered as possible factors as well as - derived from the results on tRNA mobility in the complex with synthetase - different probabilities of reaction in the complexes.

8. Literaturverzeichnis

- (1) T.O. Caspersson, Naturwissenschaften 29 (1941), 33
- (2) H. Borsook und J.W. Dubnoff, J. Biol. Chem. 132 (1940), 307
- (3) F. Lipmann, Advances Enzymol. 1 (1941), 99
- (4) H. Chantrenne, Biochim. Biophys. Acta 2 (1948), 286
- (5) M.B. Hoagland, Biochim. Biophys. Acta 16 (1955), 288
- (6) R.B. Loftfield, in Protein Synthesis, Vol. 1, (Ed. E. McConkey), M. Dekker, (1971), 1
- (7) F.H.C. Crick: A note for the RNA tie club, abgedruckt bei M.B. Hoagland in The Nucleic Acids (Ed. E. Chargaff und J.N. Davidson), Academic Press, New York, Vol. 3 (1955), 400
F.H.C. Crick, J. Mol. Biol. 19 (1966), 548
- (8) R.W. Holley, J. Apgar, G.A. Everett, J.T. Madison, M. Marquise, S.H. Merrill, J.R. Penswick und A. Zamir, Science 147 (1965), 1462
- (9) H.G. Zachau, D. Dütting und H. Feldmann, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 347 (1966), 212
- (10) R. Römer, D. Riesner, G. Maass, W. Wintermeyer, R. Thiebe und H.G. Zachau, FEBS lett. 5 (1969), 15
- (11) H.G. Zachau in The Mechanism of Protein Synthesis and its Regulation (Ed. L. Bosch), North-Holland Publishing Co., Amsterdam, (1972), 173
- (12) P. Berg und E.J. Ofengand, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 44 (1958), 78
- (13) A.H. Mehler und K. Chakraborty, Advances Enzymol. 35 (1971), 443
L.L. Kisselev und O.O. Favorova, Advances Enzymol. 40 (1974), 141
- (14) H. Beikirch, F. von der Haar und F. Cramer, Europ. J. Biochem. 26 (1972), 182

- (15) F. Fasiolo, P. Remy, J. Pouyet und J. -P. Ebel, im Druck
- (16) H. George und A. Meister, Biochim. Biophys. Acta 132 (1967), 165
- (17) F. Lemoine, J.P. Waller und R. van Rapenbusch, Europ. J. Biochem. 4 (1968), 213
- (18) H.G. Bluestein, C.C. Allende, J.E. Allende und G. Cantoni, J. Biol. Chem. 243 (1968), 4693
- (19) T.S. Papas und A.H. Mehler, J. Biol. Chem. 246 (1971), 5924
- (20) R. Calendar und P. Berg, Biochemistry 5 (1966), 1690
- (21) R.B. Loftfield und E.A. Eigner, J. Biol. Chem. 244 (1969), 1746
- (22) R.B. Loftfield und E.A. Eigner, Biochemistry 7 (1968), 1100
- (23) I.B. Rubin, A.D. Kelmers und G. Goldstein, Anal. Biochem. 20 (1967), 533
- (24) R.B. Loftfield, Biochem. J. 89 (1963), 82
R.B. Loftfield, L.I. Hecht und E.A. Eigner, Biochim. Biophys. Acta 72 (1963), 383
- (25) R.B. Loftfield und D. Vanderjagt, Biochem. J. 128 (1972), 1352
- (26) F. Chapeville, F. Lipmann, G. v. Ehrenstein, B. Weisblum, W.J. Ray jr. und S. Benzer, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 48 (1962), 1086
- (27) a. J.T. Madison, Ann. Rev. Biochem. 37 (1968), 131; b. W. Szybalski, H. Kubinsky und P. Sheldrich, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31 (1966), 123
- (28) T. Lindahl, A. Adams, M. Geroch und J.R. Fresco, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 57 (1967), 178
- (29) B. Dudock, C.Di Peri, K. Scileppi und R. Reszelbach, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68 (1971) 681
- (30) B. Roe und B. Dudock, Biochem. Biophys. Res. Comm. 49 (1972) 399

- (31) B. Roe, M. Michael und B. Dudock, *Nature* 246 (1973), 135
- (32) U. Lagerkvist, L. Rymo und J. Waldenström, *J. Biol. Chem.* 241 (1966), 5391
- (33) U. Lagerkvist und L. Rymo, *J. Biol. Chem.* 245 (1970), 435
- (34) J.G. Farrelly, J.W. Longworth und M.P. Stulberg, *J. Biol. Chem.* 246 (1971), 1266
- (35) M. Yarus und P. Berg, *J. Mol. Biol.* 28 (1967), 479
- (36) M. Yarus und P. Berg, *J. Mol. Biol.* 42 (1969), 171
- (37) R. Rigler und M. Ehrenberg, *Quart. Rev. Biophysics* 6 (1973), 139
- (38) C. Hélène, F. Brun und M. Yaniv, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 37 (1969), 393
- (39) C.J. Bruton und B.S. Hartley, *J. Mol. Biol.* 52 (1970), 165
- (40) R. Rigler, E. Cronvall, R. Hirsch, U. Pachmann und H.G. Zachau, *FEBS lett.* 11 (1970), 320
- (41) a. R. Rigler, E. Cronvall, M. Ehrenberg, U. Pachmann, R. Hirsch und H.G. Zachau, *FEBS lett.* 18 (1971), 193; b. U. Pachmann, E. Cronvall, R. Rigler, R. Hirsch, W. Wintermeyer und H.G. Zachau, *Europ. J. Biochem.* 39 (1973), 265
- (42) C. Hélène, F. Brun und M. Yaniv, *J. Mol. Biol.* 58 (1971), 349
- (43) G.R. Penzer, E.L. Bennet und M. Calvin, *Europ. J. Biochem.* 20 (1971), 1
- (44) G. Engel, H. Heider, A. Maelicke, F. von der Haar und F. Cramer, *Europ. J. Biochem.* 29 (1972), 257
- (45) J. Lapointe und D. Söll, *J. Biol. Chem.* 247 (1972), 4975
- (46) S. Blanquet, G. Fayat, J.-P. Waller und M. Iwatsubo, *Europ. J. Biochem.* 24 (1972), 461
- (47) E. Holler und M. Calvin, *Biochemistry* 11 (1972), 3741
- (48) E. Holler, E. L. Bennett und M. Calvin, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 45 (1971), 409

- (49) A. Pingoud, D. Riesner, D. Boehme und G. Maass, FEBS lett. 30 (1973), 1
- (50) G. Kraus, R. Römer, D. Riesner und G. Maass, FEBS lett. 30, (1973), 6
- (51) a. S. Blanquet, M. Iwatsubo und J. -P. Waller, Europ. J. Biochem. 36 (1973), 213; b. S. Blanquet, G. Petrissant und J. -P. Waller, ibid. 227; c. F. Lawrence, S. Blanquet, M. Poirer, M. Robert-Géro und J. -P. Waller, ibid. 234
- (52) R. Rigler, C.R. Rabl und T.M. Jovin, Rev.Sci. Instr. 45 (1974), 580
- (53) W. Wintermeyer und H.G. Zachau, FEBS lett. 18 (1971), 214
- (54) M.H. Makman und G.L. Cantoni, Biochemistry 4 (1965), 1434
- (55) M.H. Makman und G.L. Cantoni, Biochemistry 5 (1966), 2246
- (56) H. Heider, E. Gottschalk und F. Cramer, Europ. J. Biochem. 20 (1971), 144
- (57) R. Hirsch und H. G. Zachau, Manuskript in Vorbereitung
- (58) T. Igo-Kemenes und H.G. Zachau, Europ. J. Biochem. 10 (1969), 549
- (59) R. Hirsch und H.G. Zachau, Hoppe Seyler's Z. Physiol.Chem. 351 (1970), 563
- (60) H.S. Hertz und H.G. Zachau, Europ. J. Biochem. 37 (1973), 203
- (61) R.B. Loftfield und E.A. Eigner, J. Biol. Chem. 242 (1967), 5355
- (62) E. Griffiths und S.T. Bayley, Biochemistry 8 (1969), 541
- (63) V.Z. Holten und K.B. Jacobson, Arch. Biochem. Biophys. 129 (1969), 283
- (64) K.H. Muench und P. Berg in Proc. Nucl. Acid Res (Ed.G.I. Cantoni und D.R. Davis), Harper and Row, New York (1966), 375

- (65) S.L. Bradbury und W.B. Jacobi, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 69 (1972), 2373
- (66) J.F. Clark und W.B. Jacobi, J. Biol. Chem. 245 (1970), 6072
- (67) M.L. Lee und K.H. Muench, J. Biol. Chem. 244 (1969), 223
- (68) S.V. Konev, Fluorescence and Phosphorescence of Proteins and Nucleic Acids, Plenum Press, New York (1967)
- (69) C. Hélène, FEBS lett. 26 (1972), 6
- (70) F. Fasiolo, N. Befort, Y. Boulanger und J.-P. Ebel, Biochim. Biophys. Acta 217 (1970), 305
- (71) C. Hélène und F. Brun, J. Mol. Biol. 58 (1971), 349
- (72) D. Cassio und J.-P. Waller, Europ. J. Biochem. 20 (1971), 283
- (73) L.S. Lerman, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 49 (1963), 63
- (74) N.J. Pritchard, A. Blake und A.R. Peacocke, Nature 212 (1966), 1266
- (75) R.W. Armstrong, T. Kuruscev und U.P. Strauss, J. Am. Chem. Soc. 92 (1972), 3174
- (76) a. G. Schwarz, Europ. J. Biochem. 12 (1970), 442; b. G. Schwarz, S. Klose und W. Balthasar, ibid. 454; c. G. Schwarz und W. Balthasar, ibid. 461
- (77) M. Dourlent und C. Hélène, Europ. J. Biochem. 23 (1971), 86
- (78) U. Pachmann und R. Rigler, Exptl. Cell Res. 72 (1972), 602
- (79) J.B. LePecq und C. Paoletti, J. Mol. Biol. 27 (1967), 87
- (80) G. Scatchard, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51 (1949), 660
- (81) J. Charlier und H. Grosjean, Europ. J. Biochem. 25 (1972), 163
- (82) A. Danchin und M. Guéron, Europ. J. Biochem. 16 (1970), 532
- (83) C. Urbanke, R. Römer und G. Maass, Europ. J. Biochem. 33 (1973), 511

- (84) T. Tao, J.H. Nelson und Ch.R. Cantor, *Biochemistry* 9 (1970), 3515
- (85) O.F. Borissova, A.P. Potapov, A.N. Surovaya, S.N. Trubitsyn und M.V. Volkenstein, *FEBS lett.* 27 (1972), 167
- (86) W. Fuller und A. Hodgson, *Nature* 215 (1967) , 817
- (87) P. Lurquin und J. Buhet-Mahieu, *FEBS lett.* 12 (1971), 244
- (88) H.N. Christensen und G.A. Palmer, *Enzyme kinetics*, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1967)
- (89) W. Wintermeyer, *Dissertation*, München 1972
- (90) a.W.Hörz u. H.G. Zachau, *Europ. J. Biochem.* 32 (1973), 1;
b.D.Lavalette,C.I. Werkhoven, D. Bebelaar, J. Langelaar und J.D.W. van Voorst, *Chem. Phys. Lett.* 9 (1971), 230
- (91) T. Lindahl, A. Adams und J.R. Fresco, *Proc. Nat. Acad.Sci. U.S.* 55 (1966), 941
- (92) J.R. Fresco, A. Adams, R. Ascione, D. Henley und T. Lindahl, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31 (1966), 527
- (93) a.U.Lagerkvist u. J. Waldenström, *J. Biol.Chem.* 240 (1965), 2264; b. U. Lagerkvist, L. Rymo und J.Waldenström, *J. Biol.Chem.* 241 (1966), 5391; c. J.Waldenström, *Europ. J. Biochem.* 5 (1966), 239
- (94) S. Chousterman und F. Chapeville, *Europ. J. Biochem.* 35 (1972), 46
- (95) M. Yarus und S. Rashbaum, *Biochemistry* 11 (1972), 2043
- (96) K. Igarashi, K. Matsuzaki und Y. Takeda, *Biochim.Biophys. Acta* 254 (1971), 91
- (97) M. Yaniv und F. Gros, *J. Mol. Biol.* 44 (1969), 1
- (98) F.X. Cole und P.R. Schimmel, *Biochemistry* 9 (1970), 3143
- (99) T.P. Zimmerman und B. Robison, *Biochem.Biophys. Res. Comm.* 47 (1972), 1138
- (100) D. Riesner, *Dissertation*, Braunschweig 1970
- (101) C. Tanford, *Physical Chemistry of Macromolecules*, J.Wiley & Sons Inc., New York (1961), 466

- (102) W.J. Gartland und N. Sueoka, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 55 (1966), 948
- (103) J.R. Fresco, R.D. Blake und R. Langridge, Nature 220 (1968), 1285
- (104) H. Hayashi und K.J. Miura, J. Mol. Biol. 10 (1964), 345
- (105) C. Letendre, A.M. Michelson und M. Grunberg-Manago, Biochem. Biophys. Res. Comm. 23 (1966), 442
- (106) P.M. Bhargava, T. Pallaiah und E. Premkumar, J. Theor. Biol. 29 (1970), 447
- (107) F. Fittler und H.G. Zachau, Arch. Biochem. Biophys. 155 (1973), 368
- (108) W. Hörz und H.G. Zachau, Europ. J. Biochem. 32 (1973), 1
- (109) D.R. Kearns, K.L. Wong und Y.P. Wong, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 70 (1973), 3843
- (110) G.S. Adair, J. Biol. Chem. 63 (1925), 529
- (111) L. Pauling, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 21 (1935), 186
- (112) J. Monod, J. Wyman und J.-P. Changeux, J. Mol. Biol. 12 (1965), 88
- (113) D.E. Koshland jr., G. Némethy und D. Filmer, Biochemistry 5 (1966), 365
- (114) M. Eigen in Fast Reactions and Primary Processes in Chemical Kinetics (Ed. S. Claesson), Nobel Symp. 5, Almquist & Wiksell, Stockholm (1967), 333
- (115) a. C. Frieden u. R. F. Colman, J. Biol. Chem. 242 (1967), 1705;
b. C. Frieden, ibid. 4045
- (116) C. Frieden, Ann. Rev. Biochem. 40 (1971), 653
- (117) A.N. Baldwin und P. Berg, J. Biol. Chem. 241 (1966), 839
- (118) R. Parfait, Europ. J. Biochem. 38 (1973), 572
- (119) A. Cornish-Bowden und D. E. Koshland jr., Biochemistry 9 (1970), 3325

- (120) D.W. Marquardt, J.Soc.Indust. Appl. Math. 11 (1963), 431
- (121) D.A. Meeter, Non-linear Least Squares (GAUSHAUS), Univ. Wisconsin Computing Center (1964, revised 1966)
- (122) E. Cronvall, Examensarbete, Stocholm 1973
- (123) R.A. Cook und D.E. Koshland jr., Biochemistry 9 (1970), 3337
- (124) C.T. Yu und D. Hirsh, Biochim.Biophys. Acta 142 (1967), 149
- (125) B.D. Niymporn, J.L. Dahl und J. L. Strominger, J. Biol. Chem. 243 (1968), 773
- (126) D.W.E. Smith, J. Biol. Chem. 244 (1969), 896
- (127) a.R.Römer, D. Riesner, S.M. Coutts und G. Maass, Europ. J. Biochem. 15 (1970), 77; b. R. Römer, D. Riesner und G. Maass, FEBS lett. 10 (1970), 352; c. R. Rigler, U. Pachmann R.Hirsch und H.G. Zachau, Manuskript in Vorbereitung
- (128) R. Thiebe, K. Harbers und H.G. Zachau, Europ. J. Biochem. 26 (1972), 144
- (129) A. Levitzki und D.E. Koshland jr., Biochemistry 11 (1972), 247
- (130) J.-P. Ebel, R. Giege, J. Bonnet, D. Kern, N. Befort, C. Bollack, F. Fasiolo, J. Gangloff und G. Dirheimer, Biochimie 55 (1973), 547
- (131) F. Fasiolo, N. Befort, Y. Boulanger und J.-P. Ebel, Biochim. Biophys. Acta 217 (1970), 305
- (132) M. Ehrenberg, E. Cronvall und R. Rigler, FEBS lett. 18 (1971), 199
- (133) J.-L. Dimicoli und C. Hélène, Biochimie 53 (1971), 331
- (134) H.G. Zachau in H.U. Bergmeyer, Methoden der Enzymat. Analyse, Verl. Chemie Weinheim, 2. Aufl. (1970), 1828
- (135) P. Philippsen, Dissertation, München 1971
- (136) E.G. Richards, J.A. Coll und W.B. Gratzer, Anal. Biochem. 12 (1965), 452

- (137) D. Riesner, R. Römer und G. Maass, Biochem. Biophys. Res. Comm. 35 (1969), 369
- (138) Europ. J. Biochem. 15 (1970), 203; ibid. 18 (1971), 588

9. Verzeichnis der Abkürzungen

A_{280}	Extinktion bei 280 nm und 1 cm Lichtweg
EB	Ethidiumbromid
PF	Proflavin
K_m	Michaelis-Menten-Konstante mit der Benennung M
K	Assoziationskonstante mit der Benennung M^{-1}
n	Anzahl Bindungsplätze
u	Ionenstärke mit der Benennung M
p	Polarisationsgrad der Fluoreszenz
r	Anisotropie der Fluoreszenz
PRS	Phenylalanin-tRNA-Synthetase aus Hefe (EC 6.1.1.20)
SRS	Serin-tRNA-Synthetase aus Hefe (EC 6.1.1.11)
$tRNA^{Phe}$	L-Phenylalanin-spezifische Transfer-Ribonukleinsäure aus Hefe
$tRNA^{Ser}$	L-Serin-spezifische Transfer-Ribonukleinsäure aus Hefe
$tRNA_{EB}^{Phe}$	$tRNA^{Phe}$, die Ethidium anstelle von Y^+ trägt und mit $NaBH_4$ reduziert ist
$tRNA_{EB}^{Ser}$	$tRNA^{Ser}$, die Ethidium an den drei Dihydrouracil-Positio- nen enthält und $NaBH_4$ -reduziert ist
$tRNA_{HCl}^{Phe}$	$tRNA^{Phe}$ nach Abspaltung der Base Y^+
Y^+	Base des seltenen Nukleotids in der Position 37 von $tRNA^{Phe}$

Die übrigen Abkürzungen entsprechen den Regeln der IUPAC-IUB (138).

Lebenslauf

Am 8. Februar 1947 wurde ich als erster Sohn des Kaufmanns Rudolf Pachmann und seiner Ehefrau Ruth, geb. Bauer, in München geboren. Die Volksschule besuchte ich in Walchstadt bei München, München und Etterzhausen bei Regensburg, das humanistische Gymnasium in Regensburg (Regensburger Domspatzen) und in München (Wittelsbacher Gymnasium), wo ich 1966 die Reifeprüfung bestand.

Im Wintersemester 1966/67 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität München. Die Ärztliche Prüfung bestand ich hier am 19. Februar 1973. Vom 1. Mai bis 31. August 1974 arbeitete ich als Medizinalassistent an der II. Medizinischen Klinik der Universität München.

Nach der Ärztlichen Vorprüfung im Herbst 1969 begann ich am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H.G. Zachau an der vorliegenden Dissertation zu arbeiten. Ab 1. Juli 1971 setzte ich diese Arbeit im Labor von Herrn Docent R. Rigler an Institutionen för Medicinsk Cellforskning och Genetik und an Institutionen för Medicinsk Fysik, Karolinska Institutet, Stockholm, fort.

